

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *Zoogloea*
sp EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

FRANCISCO DE ASSIS DUTRA MELO

RECIFE – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *Zoogloea*
sp EM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

FRANCISCO DE ASSIS DUTRA MELO

Dissertação de mestrado apresentada por
Francisco de Assis Dutra Melo ao Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química

Área de Concentração: Processos Bioquímicos

Orientadores: Prof. Dr. Mohand Benachour
Prof. Dr. Sérgio Lucena

RECIFE – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
ESCOLA DE ENGENHARIA – DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA

Dissertação de mestrado apresentada por Francisco de Assis Dutra
Melo ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como
parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 11 DE NOVEMBRO DE 2003,
DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mohand Benachour

Prof. Dr. Sérgio Lucena

Prof. Dr. Nelson Medeiros Lima Filho

Prof^a Dr^a Maria de Fátima V. de Queiroz Souza

Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar

Este trabalho é dedicado aos meus pais Ricardo e Etelvina, que tanto se empenharam para minha formação moral e realização como profissional, e à minha família Marcília, Mayara, Bernardo, Ana e René.

AGRADECIMENTOS

- § Aos professores Mohand Benachour e Sérgio Lucena, pela orientação para a realização deste trabalho, pelo incentivo profissional e confiança demonstrados em todos os momentos.
- § Aos professores César Augusto Moraes de Abreu e Nelson Medeiros de Lima Filho, antigo e atual coordenadores, respectivamente, do curso de pós-graduação a nível mestrado em Engenharia Química, pela contribuição, orientação e incentivo profissional.
- § Aos professores do Departamento de Engenharia Química da UFPE, Sandra Maria Sarmento, Florival Rodrigues de Carvalho, Luiz Stragevitch, Andréa Stragevitch, Maria de Fátima V. de Queiroz Souza, Maria Fernanda Pimentel Avelar, Humberto Dória Silva, Maria de Los Angeles Perez F. Palha, um agradecimento especial pela valiosa contribuição e amizade.
- § Aos técnicos da EECAC/UFRPE, Carmelita Bezerra de Melo, Virgínia Medeiros Ferreira, Antonio Gonçalves Ramos, Josias Rufino dos Santos e Ricardo Otaviano de Lima, pela amizade ao longo dos anos, incentivo profissional e contribuição na realização deste trabalho.
- § Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes, Departamento de Antibióticos – UFPE, pela contribuição na caracterização do microorganismo, amizade e incentivo profissional.
- § Aos professores Eugênia Rios Maranhão e Irapuan Oliveira Pinheiro, pela valiosa colaboração.

- § À Dr^a Marion Paterson, University of Birmingham, Inglaterra, pelos estudos de caracterização do exopolissacarídeo, pelo companheirismo e amizade.
- § Ao Engenheiro Químico José Martins Palha Júnior, Petroflex Indústria e Comércio S/A, pelos estudos de caracterização física do exopolissacarídeo, pelo apoio e companheirismo.
- § Ao Prof. Maurício A. da Motta Sobrinho, do Departamento de Engenharia Química, pela realização das análises de microscopia eletrônica, executadas no Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (UP 6811), Nancy, França, pela amizade e incentivo.
- § Aos funcionários das Secretarias de Pós-Graduação Flávio Barbosa Garrett e Voleide Barros Ferreira Gomes, e de Engenharia Química, Maria do Socorro de Hollanda Ferreira Gomes, pela amizade e prestação de serviços.
- § A todos os companheiros do mestrado em Engenharia Química, especialmente Antonio Francisco Araújo Brito, Luciano André Pedrosa Vieira, Gilson Lima da Silva, Givanilda Honório Silva, Giovanna Moés Albuquerque Pontes, Andréia Lopes de Araújo Sá, Eraldo de Jesus Argolo, pela amizade sincera, pelo incentivo profissional.
- § A Usina Petribú, em especial a Dr^a Tânia Mertens, pela valiosa colaboração.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. Polímeros.....	5
2.2. Polissacarídeos.....	7
2.3. Exopolissacarídeos.....	13
2.4. Substrato.....	18
2.5. Microorganismo – <i>Zoogloea</i>	20
2.6. Cinética Microbiana.....	24
2.7. Planejamento Experimental.....	27
3. Material e Métodos.....	29
3.1. Microorganismo.....	30
3.1.1. Identificação.....	30
3.1.2. Etapas do Cultivo do Microorganismo.....	30
3.2. Produção de Exopolissacarídeo.....	31
3.2.1. Etapa I	32
3.2.2. Etapa II	35
3.3. Acompanhamento da Fermentação.....	36
3.4. Obtenção do Exopolissacarídeo	37
3.5. Estudos Estatísticos.....	37
3.6. Características Físico-Químicas.....	37
3.6.1. Composição Química do Exopolissacarídeo e Solubilidade.....	37

3.6.2. Ensaio de Fusão – DSC.....	38
3.6.3. Ensaio de Tração Mecânica.....	38
3.6.4. Análise Morfológica do Exopolissacarídeo.....	38
4. Resultados Experimentais e Discussões.....	40
4.1. Avaliação da Massa de Exopolissacarídeo Produzido – Etapa I	42
4.1.1. Estudo Paramétrico.....	42
4.1.2. Avaliação dos Efeitos Principais e de Interações.....	43
4.2. Avaliação da Biomassa.....	46
4.3. Quantificação dos Açúcares Redutores Livres.....	49
4.4. Comportamento do pH Durante o Processo Reacional.....	50
4.5. Avaliação da Concentração de Exopolissacarídeo, de Biomassa e de Substrato Residual em Condições Otimizadas – Etapa II.....	51
4.6. Características Físico-Químicas do Exopolissacarídeo.....	53
4.6.1. Composição Química e Solubilidade do Exopolissacarídeo.....	53
4.6.2. Ensaio de Fusão – DSC.....	54
4.6.3. Testes Preliminares de Tração Mecânica.....	55
4.6.4. Análise Morfológica do Exopolissacarídeo.....	56
5. Modelagem Cinética.....	58
5.1. Avaliação dos Parâmetros do Processo Reacional de Produção do Exopolissacarídeo.....	59
5.2. Otimização de Parâmetros.....	62

6. Conclusões e Perspectivas.....	71
Referências Bibliográficas.....	76
Apêndice 1. Depósito de Pedido de Patente INPI.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição média do melaço de cana-de-açúcar.....	19
Tabela 2. Planejamento experimental considerando os fatores pH, T (°C) e °Brix e os níveis (-) e (+).....	32
Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial 2 ³ levando em consideração os fatores pH, T (°C), °Brix e os níveis (-) e (+).....	33
Tabela 4. Composição do melaço – Usina Petribú – PE.....	33
Tabela 5. Massa de exopolissacarídeo (g) obtida no período do 9º ao 18º dia a partir do planejamento fatorial 2 ³	42
Tabela 6. Resultados para o planejamento fatorial 2 ³ , com valores das repetições 1 e 2 e médias relativas à massa de exopolissacarídeos nos oito ensaios, após 18 dias de experimentação.....	44
Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2 ³ e seus erros.....	45
Tabela 8. Concentração celular (g/L) obtida nos 8 ensaios pertencentes ao planejamento fatorial 2 ³	47
Tabela 9. Valores de Açúcares Redutores Livres (g/L) obtidos nos 8 ensaios, conforme planejamento experimental 2 ³	49
Tabela 10. Valores de pH observados conforme planejamento fatorial 2 ³	50

Tabela 11. Resultados obtidos (g/L) a partir da condição otimizada ($^{\circ}\text{Brix} = 10$; $\text{pH} = 4,5$ e $T = 30^{\circ}\text{C}$) para massa celular, substrato e exopolissacarídeo produzido.....	52
Tabela 12. Parâmetros de solubilidade do exopolissacarídeo, utilizando a água e o ácido trifluoroacético.....	54
Tabela 13. Teste de tração mecânica realizado no exopolissacarídeo.....	56
Tabela 14. Pesos de ponderação da função objetivo F_0 , levando em consideração os dados experimentais.....	65
Tabela 15. Limites inferiores e superiores, valores ótimos para os parâmetros cinéticos de μ_0 (dia^{-1}), K_m (g/L), K_d (dia^{-1}), K_1 , K_2 (dia^{-1}), K_3 , obtidos para os modelos de Monod e Tessier.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Zoogloea</i> s amorfas ramificadas coletadas da superfície dos filtros de gotejamento.....	21
Figura 2. Esquema dos ensaios referentes a etapa I.....	34
Figura 3. Representação geométrica das variáveis X_1 (pH), X_2 (temperatura) e X_3 (°Brix) do planejamento fatorial 2^3	46
Figura 4. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 4,5.....	48
Figura 5. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 6,0.....	48
Figura 6. Substrato (ART g/L), exopolissacarídeos (g/L) e biomassa (g/L), na condição otimizada de máxima conversão (°Brix = 10; pH = 4,5; T = 30°C).....	53
Figura 7. Termograma do exopolissacarídeo.....	55
Figura 8. Imagens do exopolissacarídeo por técnica de microscopia eletrônica de varredura.....	57
Figura 9. Análise morfológica do exopolissacarídeo realizada em microscopia eletrônica de varredura.....	57
Figura 10. Comparação entre os resultados experimentais nas condições otimizadas e as simulações utilizando-se os modelos de Monod e Tessier. a) concentração de biomassa; b) concentração de substrato; c) concentração de produto.....	68

NOTAÇÃO UTILIZADA

ART	Açúcares Redutores Totais (g/L)
C	Vetor de concentrações
DSC	Colorimetria Diferencial Exploratória
F_0	Função objetivo quadrática
GLP	Glicose, extrato de levedura, peptona
MCL	Meio completo para levedura
P	Vetor de parâmetros
YPD	Extrato de levedura, glicose e fosfato di-ácido de potássio
K_1	Coeficiente de consumo de substrato
K_2	Coeficiente de manutenção de biomassa (dia ⁻¹)
K_3	Coeficiente de produção de exopolissacarídeo
K_a	Coeficiente de agregação celular ao exopolissacarídeo (dia ⁻¹)
K_d	Coeficiente de morte celular (dia ⁻¹)
K_{de}	Coeficiente de desaparecimento total de células (dia ⁻¹)
K_m	Constante de Monod (g/L)
μ	Taxa de crescimento específico (dia ⁻¹)
μ_m	Micrômetros
μ_0	Taxa de crescimento específico máximo (dia ⁻¹)
ξ_i	Vetor erro para o componente i
Θ_i	Matriz de covariância dos dados experimentais para o componente i

RESUMO

Este trabalho objetivou o estudo cinético da produção de exopolissacarídeo por *Zoogloea* sp. em melaço de cana-de-açúcar. Inicialmente foram realizados ensaios em frascos, obedecendo a um planejamento fatorial 2^3 , tendo como variáveis independentes e os seus respectivos níveis, os seguintes valores: temperatura (30 e 35°C); pH inicial (4,5 e 6,0) e concentração inicial de substrato (10 e 15° Brix).

A condição operacional na qual se obteve a maior produção do biopolímero (6,51 g) foi aquela em que se empregou: °Brix = 10; pH = 4,5 e T = 30°C. Nesta condição otimizada foram realizados experimentos em frascos, visando determinar os parâmetros cinéticos. Após 18 dias de processo obteve-se uma conversão de substrato em biopolímero de 76,8% e de substrato em biomassa de 2,4%. Os parâmetros cinéticos determinados para os modelos de Monod e Tessier, respectivamente, foram: taxa de crescimento máximo - μ_0 (dia⁻¹) (4,249 e 4,187); constante de Monod - K_m (g/L) (2,947 e 10,000); coeficiente de desaparecimento total de células - K_{de} (dia⁻¹) (3,961 e 4,089); coeficiente de consumo de substrato pela biomassa - K_1 (0,001 e 0,395); coeficiente de manutenção de biomassa - K_2 (dia⁻¹) (1,630 e 0,001); coeficiente de produção de exopolissacarídeo - K_3 (0,264 e 0,263).

As curvas obtidas, segundo os modelos de Monod e Tessier, para os parâmetros de biomassa, substrato e produto, não apresentaram uma boa aproximação dos resultados experimentais.

O biopolímero produzido apresentou solubilidade em água (17,9%), em ácido trifluoroacético (72,2%) e a fração solúvel é constituída dos seguintes monossacarídeos: glicose (87,6%); xilose (8,6%); manose (0,8%); ribose (1,7%); galactose (0,1%); arabinose (0,4%) e ácido glucurônico (0,8%).

O exopolissacarídeo produzido exibiu diâmetro de poro em torno de 0,07 μm , temperatura de fusão de 118°C e, quando submetido aos testes de tração mecânica, apresentou os seguintes resultados: espessura (0,08 mm), carga na ruptura (0,01 kN), tensão de ruptura (30,9 MPa), alongamento na ruptura (236%).

Palavras chave: melaço, cana-de-açúcar, exopolissacarídeo, cinética microbiana, Monod e Tessier, *Zoogloea* sp.

ABSTRACT

The object of this kinetic study of the production of the exopolysaccharides by *Zoogloea* sp. in sugarcane molasses initially, experiments were realized in flasks, following a factorial planning 2^3 , having as independent variables and their respective levels, the following values: temperature (30 and 35°C), initial pH (4,5 and 6,0) and initial substrate concentration (10 and 15 °Brix).

In the operational condition that was obtained, the most biopolymer production (6,51 g) was that which was used: Brix = 10, pH = 4,5 and T = 30°C. In this optimized condition there were realized experiments in flasks, with the object of determining the kinetic parameters. After 18 days of processing, there was obtained a substrate conversion in biopolymer of 76,8% and biomass substrate of 2,4%. The kinetic parameters determined for the Monod and Tessier models, respectively, were: maximum growth rate - μ_0 (dia⁻¹) (4,249 and 4,187); constant of Monod - K_m (g/L) (2,947 and 10,000); coefficient of total absence of cells - K_{de} (dia⁻¹) (3,961 and 4,089); consumption coefficient of substrate by the biomass - K_1 (0,001 and 0,395); coefficient of biomass maintenance - K_2 (dia⁻¹) (1,630 and 0,001); coefficient of exopolysaccharide production - K_3 (0,264 and 0,263).

The obtained curves, by the Monod and Tessier models, for the biomass parameters, substrate and product, did not present a good approximation of the experimental results.

The biopolymer produced presented solubility in water (17,9%), in trifluoroacetic acid (72,2%) and the soluble fraction is constituted of the following monosaccharides: glucosid (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) and glucuronic acid (0,8%).

The exopolissaccharid produced exhibited a pore diameter of about 0,07 μm , fusion temperature of 118°C, and when submitted to the mechanical traction test, it presented the following results: with (0,08 mm), rupture charge (0,01 kN), rupture tension (30,9 MPa), rupture prolonging (236%).

Keywords: molasses, sugar cane, exopolysaccharides, microbial cynamic, Monod and Tessier, *Zoogloea* sp.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos microbianos despertam grande interesse comercial a nível mundial em função de suas propriedades reológicas e atividades biológicas, além de apresentarem alto grau de regularidade, uma vez que estão isentos de variações de ordem climática ou sazonal (SUTHERLAND, 1990, 1998).

Como exemplo de aplicação de polissacarídeo microbiano, a celulose bacteriana, cujas propriedades são diferentes da celulose de madeira, é usada em países asiáticos na alimentação e abrem novas perspectivas de aplicações potenciais industriais que incluem, entre outros: o diafragma acústico, pele artificial, membranas de filtros, elemento aditivo para papel e fibra dietética (OKIYAMA et al., 1992; TAKAI, 1994).

Os exopolissacarídeos microbianos são mais facilmente recuperados em relação aos intracelulares (GALINDO, 1995).

Outra importante característica dos polissacarídeos diz respeito às suas propriedades iônicas, classificadas como aniônicos, neutros ou catiônicos, que decorrem dos grupamentos como carboxila, fosfato, sulfeto ou amino (MARGARITIS & PACE, 1985).

Alguns polissacarídeos apresentam alta afinidade por íons metálicos e, desta forma, abrem perspectivas para utilização em sistema de tratamento d'água (SUTHERLAND, 1990; GEDDIE & SUTHERLAND, 1993).

Este trabalho tem como objetivo o estudo da cinética do processo de produção de polissacarídeos extracelulares a partir do melaço de cana-de-açúcar, fonte de carboidratos abundante na região Nordeste do Brasil, em presença da bactéria *Zoogloea* sp., com a finalidade de se obter parâmetros do processo otimizado que representem as maiores taxas de conversão do substrato em exopolissacarídeo. Foram investigadas as seguintes variáveis: a temperatura do meio reacional, o pH inicial e a concentração do substrato. A técnica do planejamento fatorial a dois níveis (2^3) foi empregada com vistas a permitir a avaliação de diferentes variáveis ao mesmo tempo, assim como, os efeitos principais e de interações de todas essas variáveis envolvidas, definindo-se o sistema reacional de máxima conversão do melaço de cana-de-açúcar em exopolissacarídeos. Foram também determinadas algumas características físico-químicas do biofilme sintetizado.

Procurou-se elaborar um modelo cinético para representar satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos com a quantificação dos parâmetros cinéticos do sistema bio-reacional nas condições operacionais otimizadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. POLÍMEROS

Pode-se definir polímeros como substâncias macromoleculares sintéticas ou naturais oriundas da união de monômeros, as quais apresentam características físico-químicas adequadas para uso na fabricação de produtos, podendo alcançar alto peso molecular (ODIAN, 1991). O polímero pode ser classificado como homopolímero quando as unidades são idênticas, ou heteropolímero, quando são constituídas por duas ou mais espécies de monômeros (WALTON & BACKWELL, 1973; TAGER, 1978; MANO, 1985).

Biopolímeros são macromoléculas de alto peso molecular, formados pela repetição de unidades fundamentais unidos numa seqüência e produzidos por várias espécies de sistemas biológicos. Os diferentes grupos funcionais dos biopolímeros podem se envolver em uma grande variedade de reações químicas (KHACHATOORIAN et al., 2003).

Como exemplo de espécies macromoleculares sintéticas orgânicas destacam-se poliestireno, náilon, teflon, entre outros, e como macromoléculas sintéticas inorgânicas podem ser citados os ácidos polifosfóricos. Os polissacarídeos, os ácidos nucleicos e as proteínas se

enquadram como macromoléculas orgânicas naturais e como exemplo de macromoléculas naturais inorgânicas, podemos destacar o diamante, o grafite e a sílica (MANO, 1985).

Polímeros sintéticos ou naturais podem ser obtidos com uma extensa variação de propriedades como rigidez, resistência mecânica, densidade e resistência térmica. A ciência dos polímeros e suas aplicações levam em consideração, como ponto de partida, a compreensão de como estes materiais são sintetizados. A síntese de polímeros revela um complexo procedimento que é determinante para a sua estrutura. De acordo com o mecanismo da reação, os monômeros podem sofrer o processo de polimerização em cadeia ou por etapas. Polimerização em cadeia descreve o método em que os monômeros são adicionados um a um na posição “ativa” da cadeia em desenvolvimento; a polimerização em etapas, por sua vez, é multireacional e quaisquer das espécies reativas podem reagir entre si. O tipo mais comum de polimerização em cadeia é a polimerização via radical livre que representa simplesmente uma molécula com um elétron desemparelhado. Este excesso de carga torna a molécula muito reativa, de forma que ela irá, facilmente, unir-se a outro radical livre (ODIAN, 1991).

A produção de biopolímeros com as propriedades da borracha são excepcionalmente raros em microorganismos procarióticos (STEINBÜCHEL, 2003).

2.2. POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas pela união de várias unidades monossacarídicas ou de seus derivados, como os açúcares aminados, ácidos urônicos e outros, através de ligações glicosídicas. Diferem dos oligossacarídeos não apenas pelo tamanho da molécula e pelas propriedades físicas que lhes conferem características de polímeros, mas também pela maior facilidade de combinações possíveis durante a biossíntese, permitindo a formação de ramificações em diferentes espécies de monossacarídeos com diferentes configurações (BOBBIO & BOBBIO, 1989; BROCK & MADIGAN, 1991; GLAZER & NIKAIDO, 1995).

Os polissacarídeos são moléculas que possuem mais de dez unidades monossacarídicas; para valores inferiores, a molécula é considerada como oligossacarídeo. De uma maneira geral, os polissacarídeos naturais contêm entre 80 a 1000 unidades monossacarídicas, podendo exceder a 3000 unidades monossacarídicas por cadeia polimérica. Por hidrólise ácida ou enzimas específicas, esses polissacarídeos produzem monossacarídeos e/ou derivados

monossacarídeos. Comportamento similar como os monossacarídeos, estas moléculas apresentam grande afinidade pela água (BOBBIO & BOBBIO, 1989; BROCK & MADIGAN, 1991; GLAZER & NIKAIDO, 1995).

Muitas bactérias produzem polímeros extracelulares independentemente de elas se propagarem em culturas de suspensão ou biofilmes. No último caso, os polímeros apresentam-se como capsulares altamente hidratados, anexados às células. Os polímeros bacterianos, quase exclusivamente polissacarídeos, têm sido estudados em virtude de sua aplicação industrial como gomas microbianas (SANFORD & BAIRD, 1983).

Polímeros extracelulares microbianos são importantes, principalmente, por duas razões fundamentais (CHARRACKLIS & MARSHALL, 1990):

a) A interação entre a célula bacteriana e o substrato, conduzindo para uma adesão irreversível, que é determinada pelas propriedades físicas das macromoléculas na superfície da célula;

b) Os polímeros extracelulares são freqüentemente observados por microscopia eletrônica como matriz extracelular, responsável pela

integridade do biofilme. Em tais casos, os polímeros aparecem como fibras condensadas se estendendo da célula.

A natureza polimérica destas moléculas, no que diz respeito às propriedades físicas dos exopolissacarídeos, tem sido estudada com sucesso por microscopia eletrônica (LAMBLIM et al., 1979; MIKKELSEN et al., 1985).

A composição química de polissacarídeos extracelulares se modifica durante o ciclo de crescimento bacteriano. UHLINGER e WHITE (1983) observaram uma quantidade maior de galactose na fração do exopolímero produzido em reator de batelada pela bactéria *Pseudomonas atlantica* em relação a outros monossacarídeos. O alto índice de reação da galactose foi observado de uma forma geral unicamente no início do ciclo com relação aos outros açúcares.

A produção de exopolissacarídeos através da síntese biológica “*in vivo*” envolve macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos (WALTON & BLACKWELL, 1973).

A dissolução dos polissacarídeos ocorre por hidratação, com substituição das ligações polímero-polímero, por ligações polímero-solvente. As interações, nestes casos, são relativamente fracas, do tipo pontes de hidrogênio (LOPES, 1996). De uma forma geral, a facilidade

com que um polissacarídeo se dissolve, depende não somente de sua estrutura primária (composição química), mas também da conformação da cadeia polimérica no solvente considerado (LOPES, 1996). A unidade predominante na maioria dos polissacarídeos é a D-glicose. Também são encontrados polissacarídeos de D-manose, D-frutose, D e L-galactose, D-xilose e L-arabinose. Outros açúcares, como L-ramnose e L-fucose podem também estar presentes (ROLLER & DEA, 1992; GARRET & GRISHAM, 1995).

No que diz respeito a sua estrutura, os polissacarídeos podem ser lineares ou ramificados. O polímero pode conter uma ou várias ramificações de tamanhos diferentes. Se a ramificação é composta por uma única unidade do mesmo monossacarídeo ao longo de toda a cadeia polimérica, a macromolécula é denominada de polissacarídeo linear substituído. Normalmente, em um homopolissacarídeo, a ligação glicosídica entre a cadeia principal e a ramificação é idêntica à que une os monossacarídeos no esqueleto polimérico. Nos heteropolissacarídeos, todas as unidades do mesmo açúcar nas ramificações estarão ligadas à cadeia principal pelo mesmo tipo de ponte glicosídica. Uma característica importante dos polissacarídeos é a sua carga iônica. Conforme a natureza da carga, são classificados como aniônicos, neutros ou catiônicos. Exemplos de polissacarídeos microbianos aniônicos incluem xantana, fosfomanana e alginato, enquanto levana, pululana e dextrana são caracterizados como polissacarídeos neutros.

Estas propriedades, segundo MARGARITIS & PACE (1985), decorrem da presença de grupamentos como carboxila, fosfato, sulfeto ou amino. GLAZER & NIKAIDO (1995) relatam que os polissacarídeos desempenham papéis específicos nas células, seja pela sobrevivência em condições adversas ou apenas como material de reserva no citoplasma.

Na natureza, os polissacarídeos apresentam distintas funções celulares que podem ser resumidas da seguinte forma: constituintes estruturais das paredes celulares de plantas superiores ou algas marinhas (celulose, hemicelulose e pectina); constituintes estruturais das paredes celulares de animais (quitina e mucopolissacarídeo); reserva metabólica das plantas (amido, dextrana, frutanas); reserva metabólica de animais (glicogênio) e proteção das plantas (retenção de água) (IMRIE & TILBURY, 1972; BROCK & MADIGAN, 1991).

Os polissacarídeos extraídos industrialmente de plantas e algas marinhas são obtidos com variações das características reológicas, visto que estão sujeitos às variações ambientais (SUTHERLAND, 1996).

Diversos polissacarídeos microbianos são produzidos comercialmente, dentre eles destacam-se, em escala industrial, a xantana (SUTHERLAND, 1998), e os derivados da dextrana, sephadex, utilizado na técnica cromatográfica e as dextranas sulfatadas, que

apresentam propriedades terapêuticas no tratamento de úlceras, além de possuírem atividade anticoagulante (KENNEDY & WHITE, 1993).

O recente interesse pela utilização de biopolímeros está relacionado ao grande número de possibilidades de aplicações, entre as quais podem ser citadas aquelas inerentes a agricultura, higiene e proteção de roupas, filtração de materiais diversos, entre outros (VELDE & KIEKENS, 2002).

A levana, polissacarídeo produzido por plantas ou microorganismos, apresenta um extenso potencial de aplicações, entre as quais destacam-se as atividades antineoplásica, imunoestimuladora e imunomoduladora (LEIBOVICI et al., 1980; HAN, 1990; CALAZANS et al., 1997).

Alguns biopolímeros apresentam importantes aplicações na área biomédica, basicamente representados por dois grupos de poliésteres que têm importância significativa neste campo. Estes grupos são degradados via hidrólise e suas taxas de degradação dependem das propriedades do meio, tais como pH, temperatura, a presença de solvente e biocatalizadores (HASIRCE et al., 2001).

2.3. EXOPOLISSACARÍDEOS

Muitos microorganismos têm a habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares como polímeros solúveis ou insolúveis em água (SUTHERLAND, 1990). A quantidade de estruturas estudadas é relativamente pequena á nível mundial, apesar do crescente interesse pelo isolamento e identificação de polissacarídeos microbianos e suas aplicações, observado nos últimos anos.

Os exopolissacarídeos são produzidos largamente por bactérias e microalgas e, menos freqüentemente, por leveduras e fungos filamentosos (ROLLER & DEA, 1992). Os polímeros de origem bacteriana apresentam maior viabilidade industrial e comercial. Entretanto, apenas uma pequena fração tem sido comercializada apesar da potencialidade para substituir as gomas obtidas a partir de plantas e algas marinhas (ROSEIRO et al., 1992; ROLLER & DEA, 1992; LOPES & ANDRADE, 1995).

Os polissacarídeos microbianos extracelulares podem ser encontrados sob duas formas diferentes: ligados à parede celular, denominado de capsulares, ou como mucos solúveis, aumentando substancialmente a viscosidade do caldo em fermentação. Estes últimos são os mais produzidos industrialmente (FENTANES, 1985).

Segundo SUTHERLAND (1990), os polímeros microbianos apresentam alto grau de regularidade, uma vez que estão isentos de flutuações de ordem climáticas ou sazonais, fato raro de ocorrer nos polissacarídeos obtidos a partir de outras fontes.

Os polissacarídeos microbianos apresentam grande interesse comercial como membro da classe dos exopolissacarídeos ou gomas industriais que são amplamente usados como espessantes, estabilizantes, gelificantes, emulsificantes, agentes de suspensão e de floculação ou colóides de proteção nas indústrias alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, de tinta, têxtil e de produtos agrícolas (MULCHANDANI et al., 1988; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995). KAY et al. (1993) enfatizam que estes exopolissacarídeos são, na sua maioria, compostos atóxicos, biodegradáveis, produzidos extracelularmente por microorganismos não patogênicos a partir de fermentações em batelada com eficiência próxima a 50% na conversão do substrato.

O conhecimento de técnicas avançadas do controle genético e das rotas biossintéticas efetuadas pelos microorganismos pode levar ao desenvolvimento de novos materiais poliméricos, implementando assim a indústria dos biopolímeros (LOPES & ANDRADE, 1995).

Recentes pesquisas na área médica apontam para a aplicação de determinados polissacarídeos como agentes terapêuticos importantes: β -D-glucanas como imunomodulador e agente antitumoral (SUTHERLAND, 1998) e levanas na terapia do câncer (CALAZANS et al., 1997), além da prevenção de doenças causadas por vírus (como AIDS e *influenza*) e por bactérias (YALPANY & SANDFORD, 1987). SUTHERLAND (1998) também cita o uso das celulosas bacterianas, assim como o emprego do ácido hialurônico em cosméticos.

Como relatam YALPANI & SANDFORD (1987) e GEDDIE & SUTHERLAND (1993), polissacarídeos bacterianos também são importantes na área ambiental, agindo na remoção de metais pesados ou radioativos de ambientes poluídos. Com a crescente preocupação dos pesquisadores na área, alguns trabalhos mostram a utilização da pululana na obtenção de material plástico biodegradável, não poluente, comestível, assim como outros artigos moldados (ALMEIDA et al., 2001).

Atualmente, tem-se verificado o interesse pelo uso da celulose de origem bacteriana. Algumas bactérias gram-negativas, tal como *Acetobacter xylinum*, têm a capacidade de produzir celulose (MASAOKA et al., 1993). Essa produção se dá na forma de uma película extracelular que rapidamente se agrega em microfibrilas celulósicas (SUTHERLAND, 1990; ALMEIDA et al., 2001). Diversas aplicações potenciais para celulose bacteriana incluem, entre outros, o diafragma

acústico, aplicadores tópicos estéreis, pele artificial, membranas de filtros, elemento aditivo para papel e fibra dietética (OKIYAMA et al., 1992).

Os polissacarídeos, devido à sua incompatibilidade com as proteínas, são exportados na forma de células-membranas ou exopolissacarídeos sob a forma encapsulada. A simultaneidade de proteção e consumo de biomoléculas pelas células depende das estruturas do polissacarídeo e da própria célula (TOLSTOGUZOV, 2003).

LEE et al. (2001) relatam a produção abundante do polissacarídeo extracelular de pigmento vermelho a partir da bactéria designada como 96 Cj 10356, isolada em sedimento marinho da Ilha de Cheju, República da Coreia.

Celulose bacteriana apresenta propriedades diferentes da celulose de madeira, entre as quais podem ser destacadas: alta cristalinidade, resistência à tensão e alto grau de polimerização (OKIYAMA et al., 1992).

De uma forma geral, a síntese dos exopolissacarídeos microbianos é realizada por fermentação aeróbica, onde os parâmetros de processo,

como temperatura, aeração e agitação, são definidos em função do tipo de material a ser produzido (HAN, 1990).

MELO et al. (1999) e COELHO et al. (2001), estudando um exopolissacarídeo produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea* sp. em substrato de melaço, realizaram testes de cicatrização cutânea em animais. Nos estudos realizados, o exopolissacarídeo determinou o controle da infecção pelo efeito bacteriostático e bactericida observados clinicamente nas avaliações, pela redução gradual da secreção presente nas feridas. Os resultados da colheita da secreção no primeiro dia de avaliação demonstraram que todas as feridas estavam contaminadas com várias espécies bacterianas, dentre elas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella sonnei*. A aplicação do exopolissacarídeo apresentou um comportamento estável, com liberação gradual de seus constituintes, observado no exsudado da ferida. Verificou-se o crescimento acelerado do tecido de granulação na fase inicial da reepitelização, com o preenchimento de todo o espaço da ferida, em média, após o quinto dia do início do tratamento. Com relação ao tempo cicatricial, observou-se que todas as feridas tratadas evoluíram sem intercorrências, com tempo cicatricial menor do que os observados na terapêutica convencional à base de anti-sépticos e pomadas cicatrizantes. Este exopolissacarídeo poderá ser utilizado em feridas cutâneas, levando em conta os aspectos relacionados ao

comportamento terapêutico, baixo custo econômico e simplicidade de aplicação.

2.4. SUBSTRATO

O melaço de cana-de-açúcar, resíduo de cristalização do processo de fabricação do açúcar, tem sido utilizado historicamente como componente na alimentação de animais, para obtenção de leveduras via propagação de células e, atualmente, quase toda a sua produção vem sendo destinada à produção de álcool, principalmente etanol.

A Tabela 1 apresenta a composição média do melaço de cana-de-açúcar, segundo OLBRICH (1960).

Tabela 1. Composição média do melaço de cana-de-açúcar.

CONSTITUINTES	% (Mássica)
Água	20,0
ORGÂNICOS	
Sacarose	32,0
Glicose	14,0
Frutose	16,0
Materiais nitrogenados, ácidos livres e Combinados e substâncias gomosas	10,0
INORGÂNICOS	
SiO ₂	0,5
K ₂ O	3,5
CaO	1,5
MgO	0,1
P ₂ O ₅	0,2
Fe ₂ O ₃	0,2
SO ₃	1,6
Cloretos	0,4

A composição química do melaço produzido é influenciada por diversos fatores, sejam de origem agrícola ou do processo industrial (MURPHY, 1979).

Segundo o Boletim da Secretaria de Produção e Comércio do Departamento de Açúcar e Alcool, vinculado ao Ministério da Agricultura do Brasil, Pecuária e Abastecimento, de 01 de maio de

2002, (MAPA, 2002), a produção de açúcar na safra 2001/2002 atingiu os patamares de 19,04 e 3,27 milhões de toneladas, considerando, respectivamente, os níveis nacional e nordestino. Estes quantitativos de produção permitem avaliar a produção de melaço de cana-de-açúcar nesta safra, respectivamente, de 7,67 e 1,32 milhões de toneladas do produto, com o teor médio de Açúcares Redutores Totais em torno de 55%.

Esta disponibilidade de carboidratos, agregada ao atraente valor comercial, credencia o melaço de cana-de-açúcar como matéria prima competitiva para a produção de novos produtos de alto valor agregado, entre os quais pode-se citar os exopolissacarídeos, dextrana, xantana, L. lisina, etc.

2.5. MICROORGANISMO – *ZOOGLOEA*

As bactérias do gênero *Zoogloea* pertencem à família *Pseudomonadaceae*, são Gram-negativas, apresentam células em forma de bastonetes arredondadas, algumas vezes cônicas, medindo, em média, de 1,0 a 1,3 μm de diâmetro por 2,1 a 3,6 μm de comprimento. Não formam esporos. As células em culturas envelhecidas são encapsuladas. Em culturas novas são móveis, apresentando um único flagelo polar. Em meio contendo sais orgânicos são formados grânulos intracelulares de β hidroxibutirato (UNZ et al., 1984).

As culturas iniciam a formação de flocos e filmes no meio líquido, no estágio posterior à fase de crescimento exponencial. As células formam uma massa embebida em uma matriz gelatinosa denominada zoogléia, distinguida por uma morfologia típica em forma de árvore e dedos, conforme observa-se na Figura 1 (PELCZAR et al., 1996).

O crescimento celular da *Zoogloea* ocorre, geralmente, a 9°C não encontrando referências sobre a existência deste processo à temperaturas superiores a 45°C (UNZ et al., 1984).

As bactérias com estruturas que apresentavam projeções semelhantes a dedos, foram chamadas *Zoogloea ramígera* por ITZIGSOHN (1868).



Figura 1. *Zoogleias* amorfas ramificadas coletadas da superfície dos filtros de gotejamento (PELCZAR et al., 1996).

Bactérias diferentes, morfológica e bioquimicamente, que apresentavam estruturas semelhantes a dedos, foram classificadas como *Z. ramígera* (BUTTERFIELD, 1935; CRABTREE et al., 1965; FRIEDMAN et al., 1968; UNZ, 1971; UNZ & DONDERO, 1967).

Um encadeamento de células do gênero *Zoogloea* é raro. Em culturas envelhecidas, as células podem aparecer alongadas (UNZ et al., 1984).

A preservação da *Zoogloea* pode ser realizada de forma indefinida por liofilização; esta bactéria não sobrevive, contudo, a uma refrigeração prolongada.

As colônias jovens da bactéria em meio sólido sob atmosfera normal de ar são transparentes e puntiformes, podendo medir de 1 a 2 mm de diâmetro e exibir centros opacos. As colônias não são pigmentadas. São aeróbicas, porém podem apresentar crescimento anaeróbico em presença de nitrato, realizando o processo de desnitrificação que consiste na redução do nitrato a N_2 . A temperatura ideal para o crescimento é de 28 – 37°C, e o pH ótimo está compreendido entre 7,0 e 7,5. O teste de oxidase é positivo e o de catalase raramente positivo. Muitas cepas são urease positivas, são quimiorganotróficas (UNZ et al., 1984).

De uma forma geral, as bactérias são encontradas principalmente em águas organicamente poluídas e em todos os estágios do tratamento de água (UNZ et al., 1984).

As bactérias do gênero *Zoogloea* são capazes de utilizar diversas fontes de carbono: ácidos orgânicos (fumárico, lácto e pirúvico), álcoois, sais de alguns ácidos (benzoato e m-toluato) e aminoácidos dicarboxílicos (asparagina, glutamato e aspartato) (UNZ et al., 1984).

Como fonte de nitrogênio orgânico utilizam aminoácidos dicarboxilados e amônia; o nitrato é inadequado (UNZ et al., 1984).

Zoogloea ramígera produz o polissacarídeo Zooglan, composto por D-glucose, D-galactose e ácido pirúvico, na relação de aproximadamente 11:3:1.5 (IKEDA et al., 1982). A estrutura do Zooglan varia com as condições de fermentação (LEE et al., 1997).

Métodos imunológicos foram desenvolvidos para detectar linhagens de *Zoogloea* (LU et al., 2001).

2.6. CINÉTICA MICROBIANA

Os microorganismos se propagam em várias condições de cultivo, sendo o crescimento e outras atividades fisiológicas uma resposta às condições estabelecidas.

A cinética microbiana descreve o crescimento, o consumo de substrato limitante e a formação de produto pelos microorganismos.

No crescimento celular em batelada, quatro fases principais podem ser observadas: fase de latência, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e fase de morte. Na fase de latência inexistente crescimento significativo, é um período de adaptação do microorganismo. Na fase de crescimento exponencial a biomassa aumenta exponencialmente e a velocidade de crescimento é máxima. A fase estacionária ocorre quando a biomassa permanece constante, devido à concentração do substrato ser insuficiente ou à inibição por algum produto. E, finalmente, a fase de morte, onde ocorre uma diminuição no número de células vivas (PIRT, 1975; BAILEY & OLLIS, 1986).

O crescimento microbiano é, geralmente, caracterizado pelo tempo necessário à duplicação da massa celular ou do número de células, os quais não são necessariamente iguais, pois a massa celular

pode aumentar sem que ocorra o aumento no número de células. O crescimento microbiano é um processo de conversão em que os nutrientes são transformados em massa celular. Este processo pode ser quantificado pelo coeficiente de rendimento, que é expresso pela massa de células formada por unidade de massa do nutriente (GOUVEIA, 1997).

A modelagem cinética tem como objetivo ordenar os dados experimentais de forma a expressar os resultados de forma clara e conclusiva (SINCLAIR & CANTERO, 1990).

Com o objetivo de simplificar a resolução do processo, algumas considerações são adotadas na modelagem cinética: despreza-se a existência de indivíduos de idades e metabolismos diferentes, ou seja, considera-se uma célula média; admite-se a hipótese do crescimento balanceado, sendo o meio de cultura formulado contendo todos os componentes em excesso, exceto o substrato limitante do crescimento. O modelo, portanto, é não segregado e não estruturado (BAILEY & OLLIS, 1986).

O método de classificar as reações depende do número e tipos de fases do sistema ou, em alguns casos, dos compartimentos envolvidos. A fase é uma parte do sistema, que é uniforme, quimicamente e fisicamente. A reação é dita homogênea quando é efetivada em uma só

fase. A reação é heterogênea quando ocorre, no mínimo, duas fases. Desta forma, todas as reações microbiológicas são heterogêneas, visto que a biomassa se constitui numa fase sólida e o substrato na fase líquida. No sistema reacional heterogêneo, tais como biofilmes, os reagentes são transportados de uma fase para outra, e a taxa de transporte de massa pode controlar toda a taxa do processo. Os processos mais lentos da série são determinantes sobre a taxa total (CHARRACKLIS & MARSHALL, 1990).

A conversão bioquímica difere da conversão química de diversas maneiras (CHARRACKLIS & MARSHALL, 1990):

- § As reações microbiológicas são geralmente irreversíveis, estando o ponto final estequiométrico relacionado geralmente ao consumo total de um dos reagentes. Desta forma, o estado de equilíbrio é considerado trivial sob o ponto de vista do microorganismo;
- § Todas as reações microbianas ocorrem em duas fases, no mínimo, (sólida e líquida), portanto são heterogêneas;
- § Baixas concentrações de reagentes e produtos, em adição às características heterogêneas acima mencionadas, têm como consequência o aumento potencial das limitações de transferência de massa;

- § As reações microbianas, freqüentemente representadas por equações estequiométricas, consistem de uma cadeia de reações enzimáticas;
- § As reações são, geralmente, autocatalíticas, isto é, biomassa e enzimas relacionadas aumentam à medida que a reação progride;
- § A biomassa apresenta uma estrutura que influencia as reações cinéticas e estequiométricas.

2.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de maneira que ele seja capaz de fornecer as informações que necessitamos (BARROS NETO et al., 1995).

Nos planejamentos fatoriais demonstrou-se que todos os fatores de interesse poderiam variar simultaneamente e seus efeitos individuais e interações poderiam ser estimados por um tratamento matemático (DEMING & MORGAN, 1987).

Os planejamentos fatoriais a dois níveis são de grande importância, pois necessitam de uma base experimental reduzida, indicando as maiores tendências e determinando a direção para a experimentação (BOX et al., 1978; BARROS NETO et al., 1995).

Atualmente, esta ferramenta tem sido usada de forma marcante para os processos químicos e bioquímicos com grande sucesso.

O primeiro passo é determinar quais os fatores e respostas de um sistema em um planejamento experimental. Os fatores são as variáveis controladas pelo experimentador que deve selecionar um número fixo de níveis para cada fator e realizar os experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis. Um planejamento fatorial envolvendo três fatores com cada um variando em dois níveis (superior e inferior) é chamado de um fatorial 2^3 , onde todas as possíveis combinações dos níveis e fatores escolhidos estão presentes no planejamento experimental (BOX et al., 1978).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMO

3.1.1. IDENTIFICAÇÃO

O microorganismo utilizado nos ensaios experimentais, a bactéria *Zoogloea* sp., isolada no ano de 1990, no Laboratório de Microbiologia Industrial da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A identificação do microorganismo foi realizada pelo Professor José Otamar Falcão de Moraes, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco, em 1994, mantido sob refrigeração a 4°C.

3.1.2. ETAPAS DO CULTIVO DO MICROORGANISMO

a) Meio para Manutenção da Cultura

A cultura original do microorganismo do gênero *Zoogloea* sp. foi mantida em meio GLP, composto, em g/L, de: glicose (20,0); extrato de levedura (5,0); peptona (3,0); agar (15,0) e pH ajustado para 6,8.

b) Meios para Propagação Celular

Nos estudos preliminares, visando a produção de exopolissacarídeos via propagação da *Zoogloea* sp. em melaço, foi utilizado o meio de cultivo MCL (ARAÚJO, 1985), composto, em g/L, de peptona (10,0); extrato de levedura (10,0); fosfato di-básico de potássio (0,5); glicose (20,0) e agar (20,0).

c) Preparação do Inóculo

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de verificar a relação técnico-operacional: inóculo/substrato, sendo definida a proporção de 20% (V/V) de inóculo em suspensão, preparado com melaço de cana-de-açúcar e cultivado nas seguintes condições: °Brix = 15, pH = 5,5 e T = 30°C e, sem agitação, por 240 horas.

Para obtenção do inóculo, o microorganismo foi cultivado em 5 litros de substrato de melaço, apresentando peso seco correspondente a 3,67 g/L.

3.2. PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO

Os estudos foram realizados em duas etapas quanto a sua metodologia:

3.2.1. ETAPA I

Nesta etapa, com o objetivo de se determinar as condições otimizadas de conversão do substrato em exopolissacarídeo, foram executados ensaios utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 .

As três variáveis investigadas, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH inicial e concentração de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), foram estudadas em dois níveis de fatores representados por (-) para o baixo nível e (+) para o nível alto, de acordo com o planejamento experimental explicitado na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Planejamento experimental considerando os fatores pH, T ($^{\circ}\text{C}$) e $^{\circ}\text{Brix}$ e os níveis (-) e (+).

FATORES	NÍVEIS	
	-	+
$^{\circ}\text{Brix}$	10	15
pH	4,5	6,0
T ($^{\circ}\text{C}$)	30	35

Com base nos fatores e níveis, foi realizada a matriz de planejamento fatorial 2^3 (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial 2^3 levando em consideração os fatores pH, T (°C), °Brix e os níveis (-) e (+).

ENSAIO	°Brix	pH	T°C
1	-	-	-
2	-	+	-
3	-	-	+
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	+	-
7	+	-	+
8	+	+	+

As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 120 mL de substrato e 30 mL de suspensão durante o período de 18 dias.

O substrato utilizado nos ensaios, o melaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela unidade industrial Usina Petribú, localizada no município de Lagoa de Itaenga – PE. Na Tabela 4, a seguir, verifica-se a composição do melaço utilizado nos experimentos.

Tabela 4. Composição do melaço – Usina Petribú – PE.

CONSTITUINTE	% (Mássica)
Substância seca	81,00
Sacarose	36,57
Açúcares Redutores Livres	19,96
Açúcares Redutores Totais	57,39
Cinzas (600°C)	9,69

Foram inoculados 144 frascos correspondentes a 36 frascos de Erlenmeyer para cada tratamento: A ($^{\circ}\text{Brix} = 10$; $\text{pH} = 4,5$; $T = 30^{\circ}\text{C}$); B ($^{\circ}\text{Brix} = 10$; $\text{pH} = 6,0$; $T = 30^{\circ}\text{C}$); C ($^{\circ}\text{Brix} = 15$; $\text{pH} = 4,5$; $T = 35^{\circ}\text{C}$) e D ($^{\circ}\text{Brix} = 15$; $\text{pH} = 6,0$; $T = 35^{\circ}\text{C}$), conforme a Figura 2, levando em consideração o período do estudo e as amostras coletadas em duplicata.

A correção do mosto, para os pH definidos no planejamento experimental, foi realizada com soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, ambas a 2,5M.

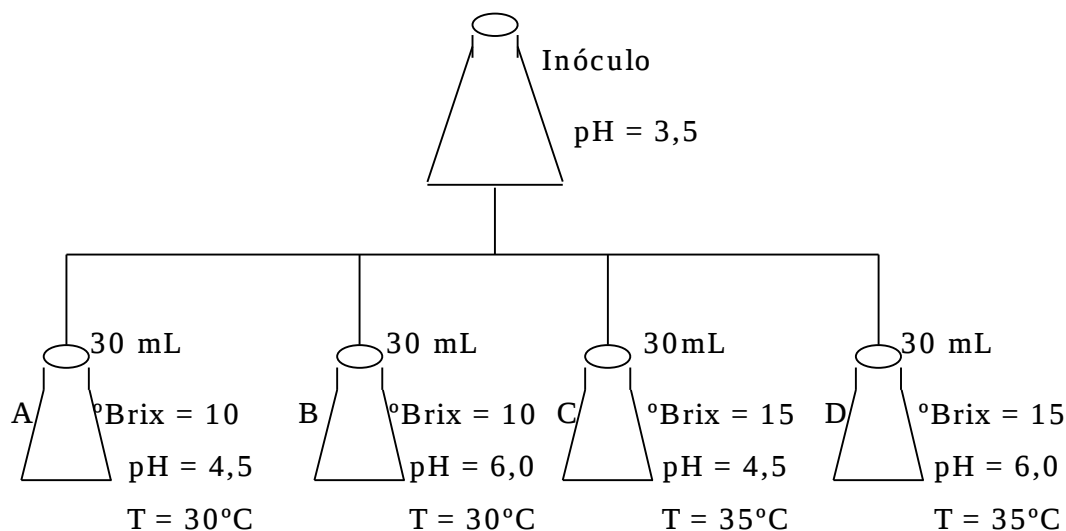


Figura 2. Esquema dos ensaios referentes a etapa I.

Todos os pontos de amostragem dos ensaios foram realizados em duplicata e as determinações analíticas do substrato, microorganismo e produtos, foram analisados nos intervalos de 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias consecutivos, após inoculação do meio.

O meio contendo substrato de melaço foi ajustado o seu Brix conforme planejamento experimental, em seguida, autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após resfriamento, o substrato foi inoculado com a cultura do gênero *Zoogloea* sp. e mantido sem agitação, em estufas de cultura calibradas a 30°C e a 35°C.

3.2.2. ETAPA II

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em repouso, em triplicata, de acordo com as condições otimizadas (°Brix = 10; pH = 4,5; T = 30°C) de máxima conversão substrato-exopolissacarídeo, definidas pelo planejamento fatorial 2³. As amostras foram retiradas no início e após 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias de fermentação, e feitas determinações de biomassa celular, Açúcares Redutores Totais e peso do exopolissacarídeo produzido. O inóculo foi obtido de acordo com a metodologia utilizada na etapa I.

3.3. ACOMPANHAMENTO DA FERMENTAÇÃO

Em todas as etapas do processo fermentativo, desde o início dos ensaios até sua conclusão, foram retiradas amostras para a determinação dos seguintes parâmetros:

- § %Sólidos Solúveis Totais – O teor dos sólidos solúveis totais foi determinado por Refratômetro digital marca Acatec modelo RDA 8.500.
- § %Açúcares Redutores Livres e Açúcares Redutores Totais – Os Açúcares Redutores Livres e Totais foram determinados utilizando-se a metodologia de EYNON & LANE (ICUMSA, 1994).
- § Biomassa – A dosagem de biomassa foi realizada através da metodologia do peso seco. O mosto fermentado foi centrifugado, lavado, seco em estufa mantida a 98°C durante 48 horas e pesado em balança analítica (VASCONCELOS, 1987).
- § Medidas de pH – As medidas de pH das amostras foram realizadas em potenciômetro digital marca Digimed modelo DMPH-2.

3.4. OBTENÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO

As amostras do exopolissacarídeo, obtidas durante o crescimento da *Zoogloea* sp. em melaço, foram retiradas dos frascos, posteriormente lavadas com água destilada, secas em estufa a 45°C e pesadas. Nos ensaios de caracterização físico-química da tração mecânica, da fusão e da morfologia, o material foi tratado com solução de hipoclorito de sódio a 5% para eliminação dos açúcares residuais.

3.5. ESTUDOS ESTATÍSTICOS

Nos estudos estatísticos foi empregado o programa MatLab 4.0, usando os dados oriundos do planejamento experimental 2³.

3.6. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

3.6.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXOPOLISSACARÍDEO E SOLUBILIDADE

Os estudos iniciais de caracterização química foram realizados no Laboratório de Biotecnologia, Grupo de Carboidratos e Proteínas da University of Birmingham, UK, utilizando, para solubilidade do material, a água e o ácido trifluoroacético 2M e 12,85M.

Nas frações solúveis foram determinadas as composições químicas dos polissacarídeos, utilizando cromatografia líquida de alta resolução, sistema Dionex DX-500 composto por bomba modelo GP 40 e detetor eletroquímico Dionex ED 40. As colunas analíticas utilizadas foram da Carbopac PA1 de 250 x 4,0 mm ID e 50 x 4,0 mm ID.

3.6.2. ENSAIOS DE FUSÃO – DSC

Nos testes para se determinar a temperatura de fusão foi empregado o método de calorimetria diferencial exploratória – DSC (ARGÔLO, 2002).

3.6.3. ENSAIOS DE TRAÇÃO MECÂNICA

Os testes de tração foram realizados na empresa Petroflex Indústria e Comércio S/A Pernambuco, no equipamento eletromecânico Extensometer de marca Instron e modelo 4400, onde foram especificados a espessura, carga na ruptura (kN), tensão na ruptura (MPa) e alongamento na ruptura (%).

3.6.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO

Imagens do exopolissacarídeo foram realizadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 2.000 até

10.000X pelo “Laboratoire des Sciences du Génie Chimique”, Nancy, França, com o objetivo de estimar a distribuição de tamanhos e o tamanho médio dos poros do exopolissacarídeo.

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES

No presente capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos em duas etapas sucessivas do trabalho. A primeira etapa consiste essencialmente na avaliação dos efeitos das variáveis significativas do processo reacional de conversão do substrato em exopolissacarídeos, após 18 dias de experimentação, aplicando-se o planejamento fatorial 2^3 . Nesta etapa foram realizados experimentos visando a produção de polissacarídeos extracelulares a partir do melaço da cana-de-açúcar em presença da bactéria *Zoogloea* sp., sendo estimados os efeitos de três parâmetros essenciais: temperatura, pH e °Brix. Também foram avaliados nos ensaios os comportamentos do crescimento celular, do consumo dos açúcares redutores livres e do pH. Na segunda etapa foram quantificados os valores de ART, massa celular e do exopolissacarídeo, obtidos em condições operacionais otimizadas, identificadas na primeira etapa deste trabalho. Foram também realizados testes preliminares visando avaliar as características físicas e químicas dos filmes de exopolissacarídeo produzidos, no que concerne às propriedades mecânicas, composição e solubilidade, temperatura de fusão e morfologia dos biofilmes sintetizados.

4.1. AVALIAÇÃO DA MASSA DE EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO – ETAPA I

4.1.1. ESTUDO PARAMÉTRICO

A determinação das condições operacionais de pH, de temperatura e de °Brix, visando a obtenção de máxima conversão de substrato em massa de exopolissacarídeo, foi efetuada de acordo com a metodologia desenvolvida no item 3.2, onde se aplicou o planejamento fatorial 2^3 .

Os resultados experimentais obtidos encontram-se na Tabela 5, ressaltando-se que todos os valores são médios obtidos de duplicata e que o tempo experimental foi de 18 dias.

Tabela 5. Massa de exopolissacarídeo (g) obtida no período do 9º ao 18º dia a partir do planejamento fatorial 2^3 .

ENSAIO DIA	1	2	3	4	5	6	7	8
9º	1,530	nd*	2,810	3,100	nd*	nd*	nd*	nd*
11º	1,780	2,200	2,910	3,520	1,010	nd*	nd*	1,610
14º	4,230	4,100	3,020	4,210	1,630	2,010	0,310	1,740
16º	5,500	5,200	4,060	4,530	1,630	3,220	0,910	1,910
18º	6,510	5,200	4,100	4,650	3,210	3,360	1,810	2,830

* nd = não determinado

Verifica-se que os ensaios 1 ($^{\circ}\text{Brix} = 10$, $\text{pH} = 4,5$ e $T = 30^{\circ}\text{C}$), 3 ($^{\circ}\text{Brix} = 10$, $\text{pH} = 4,5$ e $T = 35^{\circ}\text{C}$) e 4 ($^{\circ}\text{Brix} = 10$, $\text{pH} = 6$ e $T = 35^{\circ}\text{C}$) apresentaram formação polimérica a partir do nono dia, diferentemente dos demais que, em alguns casos, só após o décimo primeiro dia foi possível determinar a massa de exopolissacarídeo.

Comparando-se os resultados obtidos, fica evidenciado que o ensaio 1, $^{\circ}\text{Brix} = 10$, $\text{pH} = 4,5$ e $T = 30^{\circ}\text{C}$, apresentou a maior conversão substrato – exopolissacarídeo após o tempo de 18 dias consecutivos de experimentação, de 6,510 g, diferentemente para o ensaio 7, $^{\circ}\text{Brix} = 10$, $\text{pH} = 6$ e $T = 35^{\circ}\text{C}$, onde se verificou o menor valor, de 1,810 g.

4.1.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÕES

A Tabela 6 resume os resultados do planejamento fatorial 2^3 relativo a produção de exopolissacarídeos obtidos nos oito ensaios após 18 dias de experimentação, sendo cada ensaio realizado em duplicata.

Tabela 6. Resultados para o planejamento fatorial 2^3 , com valores das repetições 1 e 2 e médias relativas à massa de exopolissacarídeos nos oito ensaios, após 18 dias de experimentação.

Ensaio	pH	T	°Brix	MASSA DE EXOPOLISSACARÍDEO (g)		
				Rep. 1	Rep. 2	Média
1	4,5	30	10	6,37	6,65	6,51
2	6,0	30	10	5,50	4,90	5,20
3	4,5	35	10	3,95	4,25	4,10
4	6,0	35	10	5,06	4,24	4,65
5	4,5	30	15	3,29	3,13	3,21
6	6,0	30	15	3,41	3,31	3,36
7	4,5	35	15	1,02	2,60	1,81
8	6,0	35	15	2,65	3,01	2,83

Utilizando o algoritmo de BARROS NETO et al. (1995) e o programa Matlab, os efeitos principais e de interações foram calculados como pode ser observado na Tabela 7, que contém a média global, os efeitos principais e de interações com seus respectivos erros padrão. Aplicando a significância estatística f para 8 graus de liberdade e 95% de confiança (t / teste de Student = 2,306) obtém-se o valor $f \times S = 0,567$, sendo S o erro padrão avaliado a $\pm 0,246$.

Comparando os valores dos efeitos com o encontrado no teste- t , verifica-se que os efeitos principais envolvendo o pH e temperatura e a

interação entre os fatores °Brix e pH foram estatisticamente significativos.

Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e seus erros.

Média	3,959	$\pm 0,123$
Efeitos Principais		
(1) pH	-1,223	$\pm 0,246$
(2) Temperatura	-2,313	$\pm 0,246$
(3) °Brix	0,103	$\pm 0,246$
Interação de Fatores		
1 2	0,25750	$\pm 0,246$
1 3	0,68250	$\pm 0,246$
2 3	0,48250	$\pm 0,246$
1 2 3	-0,24750	$\pm 0,246$

Os dados experimentais permitem definir o modelo estatístico experimental com 94,09% de variância, expressa pela equação seguinte:

$$Y = 3,956 - 0,611 \text{ pH} - 1,156 T + 0,341 \text{ °Brix.pH} \quad (1)$$

A interpretação geométrica dos efeitos das variáveis X_1 (pH), X_2 (temperatura) X_3 (°Brix) do planejamento fatorial 2^3 estão representados por um cubo (Figura 3).

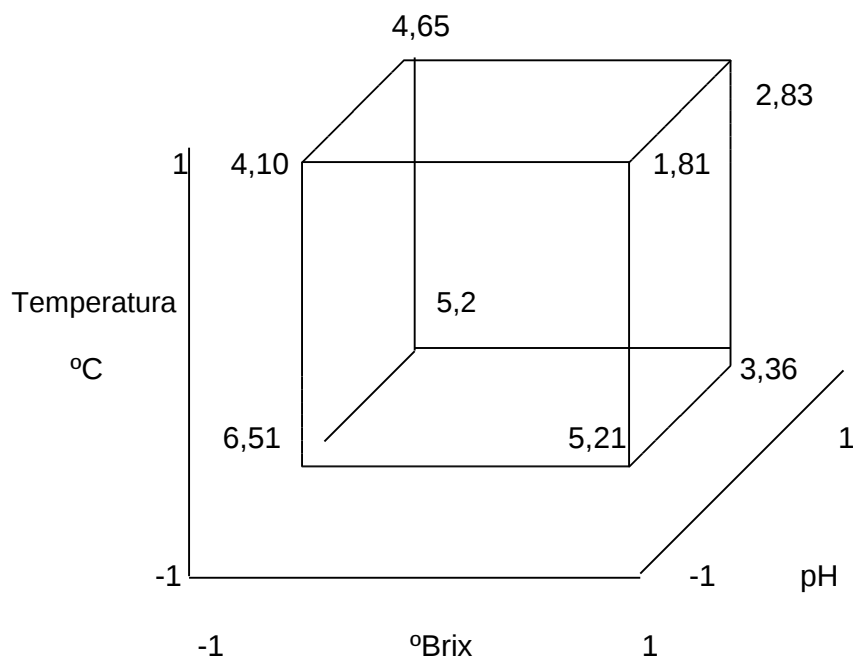


Figura 3. Representação geométrica das variáveis X_1 (pH), X_2 (temperatura) e X_3 ($^{\circ}\text{Brix}$) do planejamento fatorial 2^3 .

Nos resultados obtidos, relativos ao planejamento fatorial, observa-se que os efeitos da temperatura e do pH são fatores importantes que influenciam aumentando o grau de polimerização, enquanto a interação pH e $^{\circ}\text{Brix}$ tende a aumentar a massa de polissacarídeos sintetizados.

4.2. AVALIAÇÃO DA BIOMASSA

Os resultados obtidos na avaliação da massa celular (g/L), correspondentes aos ensaios do planejamento fatorial 2^3 , estão listados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração celular (g/L) obtida nos 8 ensaios pertencentes ao planejamento fatorial 2^3 .

ENSAIO DIA \	1	2	3	4	5	6	7	8
0	1,000	0,935	0,943	0,854	1,000	0,935	0,943	0,853
2°	1,000	1,601	1,276	1,853	1,000	1,601	1,943	1,853
4°	1,000	1,601	1,276	1,853	1,000	1,935	2,276	1,853
7°	2,000	2,268	1,943	2,853	1,667	2,268	2,276	4,187
9°	2,333	2,601	1,943	3,187	2,000	3,268	2,276	4,520
11°	2,333	2,935	2,610	3,853	3,333	3,268	4,276	4,853
14°	2,000	2,601	2,943	1,853	2,333	3,268	3,610	2,520
16°	1,000	2,601	1,943	1,853	2,011	1,268	3,276	2,187
18°	1,000	1,935	0,943	1,520	1,000	1,268	2,276	1,950

Observa-se nos ensaios 1 e 5, ambos com valores iguais para o pH = 4,5 e T = 30°C, período maior de adaptação do microorganismo quando comparados aos demais experimentos.

Ressalta-se que os ensaios 4, 7 e 8 apresentaram os maiores valores de biomassa celular (g/L), e que os menores foram observados nos ensaios 1, 3 e 5, após 18 dias de experimentação.

Apresenta-se nas Figuras 4 e 5, a distribuição da massa de biomassa celular (g/L) em função do tempo, respectivamente, para os ensaios pH = 4,5 e pH = 6,0.

Os baixos valores para concentração celular (g/L) verificados após 16 dias de experimentação, em todos os ensaios, estão associados a agregação do microorganismo ao exopolissacarídeo.

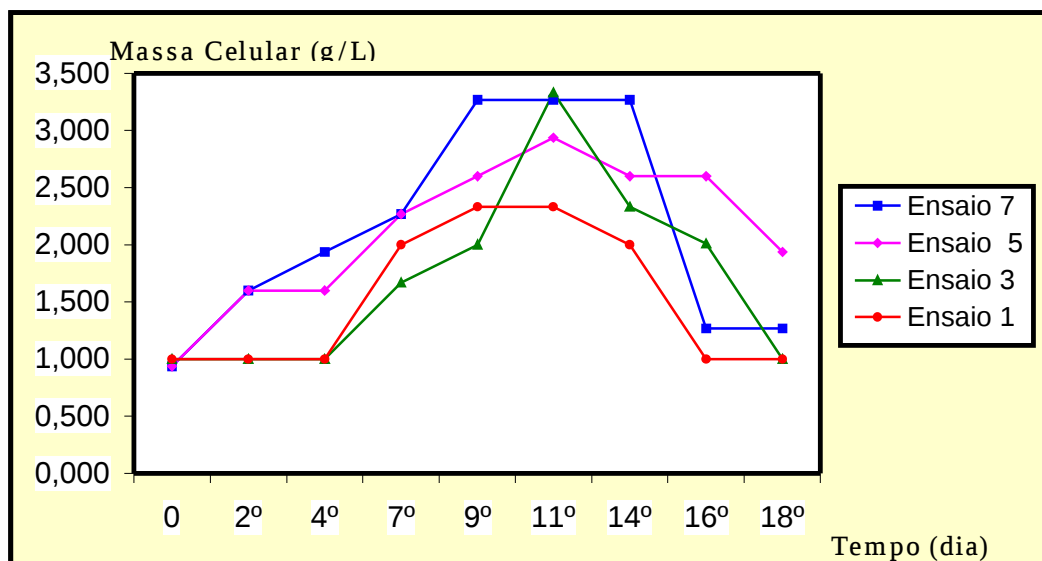


Figura 4. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 4,5.

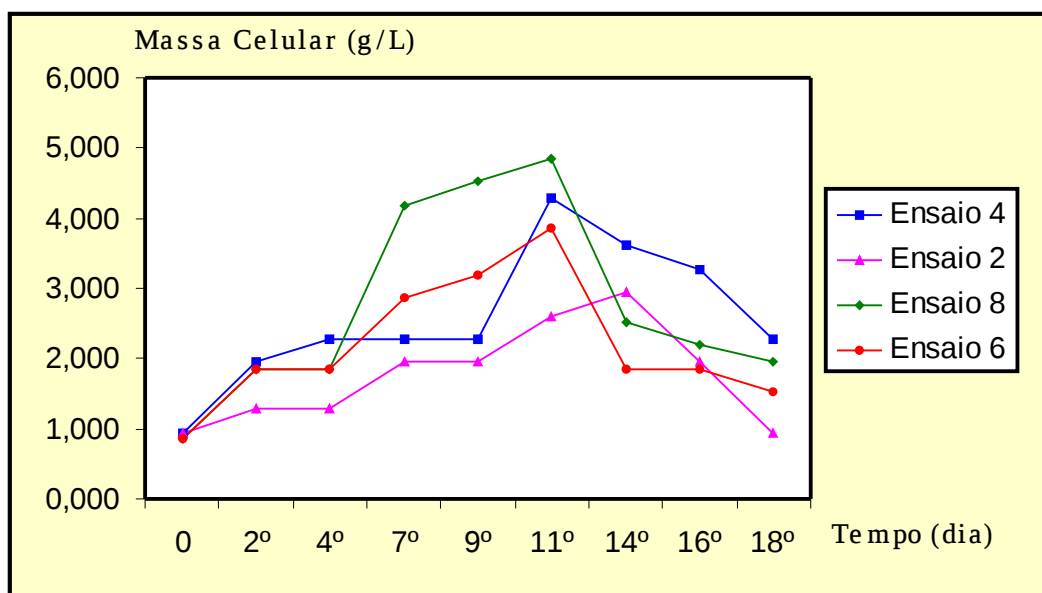


Figura 5. Dados de massa celular (g/L) para os tratamentos definidos no planejamento fatorial 2^3 , sendo pH = 6,0.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES LIVRES

Os resultados experimentais obtidos para os Açúcares Redutores Livres estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores dos Açúcares Redutores Livres (g/L) obtidos nos 8 ensaios, conforme planejamento experimental 2³.

ENSAIOS DIA	1	2	3	4	5	6	7	8
2	3,03	3,14	1,32	1,87	2,92	3,57	1,28	1,61
4	2,73	3,13	0,96	1,74	2,87	3,25	0,70	1,16
7	2,69	3,11	0,69	1,18	2,10	2,82	0,56	1,14
9	2,53	3,09	0,53	1,16	1,83	2,58	0,54	1,14
11	2,50	2,54	0,50	0,84	1,75	2,14	0,51	0,79
14	2,42	2,54	0,50	0,82	1,67	1,63	0,47	0,78
16	2,12	2,44	0,49	0,74	1,66	1,32	0,46	0,78
18	1,53	2,44	0,49	0,72	1,62	1,19	0,46	0,78

Os teores de Açúcares Redutores Livres, determinados ao longo dos experimentos, apresentaram valores superiores para os ensaios 1, 2, 5 e 6, nos quais foi fixada a temperatura de 30°C, sendo registrado que no ensaio 2 (°Brix = 10, pH = 6 e T = 30°C) o valor do teor de açúcar livre residual é superior aos observados nos demais ensaios.

Para os ensaios 3, 4, 7, e 8, com temperatura fixada em 35°C, foram observados os menores teores de Açúcares Redutores Livres.

Verifica-se, após 18 dias de experimentação, valores residuais significativos para o ARL (g/L), especialmente para o ensaio 2 (°Brix = 10, pH = 6,0 e T = 30°C).

4.4. COMPORTAMENTO DO pH DURANTE O PROCESSO REACIONAL

A variação do pH durante os ensaios do planejamento 2³ encontra-se na Tabela 10. Verifica-se que em todos os casos analisados o microorganismo foi capaz de variar o valor do pH do meio para uma faixa entre 3.3 e 3.8, durante os 18 dias de experimentação.

Tabela 10. Valores de pH observados conforme planejamento fatorial 2³.

DIA \ ENSAIO	pH							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	4,5	6,0	4,5	6,0	4,5	6,0	4,5	6,0
2	3,9	4,0	3,8	4,0	4,0	4,1	3,8	4,0
4	3,8	4,0	3,7	3,9	4,0	4,1	3,8	4,0
7	3,7	3,9	3,5	3,9	3,7	4,0	3,5	4,0
9	3,7	3,7	3,5	3,8	3,7	4,0	3,5	3,8
11	3,6	3,5	3,5	3,8	3,5	3,7	3,5	3,8
14	3,5	3,5	3,4	3,8	3,5	3,7	3,5	3,8
16	3,5	3,5	3,4	3,6	3,5	3,7	3,4	3,8
18	3,5	3,5	3,3	3,6	3,5	3,7	3,3	3,8

Observa-se os menores valores de pH (3,3) para os ensaios 3 e 7, ambos executados com pH = 4,5 e T = 30°C. Para o experimento 8 (°Brix = 15, pH = 6,0, T = 35°C) verificou-se o índice mais elevado do pH (3,8).

4.5. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO, DE BIOMASSA E DE SUBSTRATO RESIDUAL EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS – ETAPA II

Identificadas as condições otimizadas de produção do exopolissacarídeo (°Brix = 10, pH = 4,5 e T = 30°C), etapa I, foram desenvolvidas nestas condições, etapa II, experimentos de fermentação em triplicata, objetivando disponibilizar dados precisos e reprodutivos da concentração mássica do biofilme produzido, da concentração da massa celular e do teor de açúcares redutores totais (ART) para modelagem cinética da biorreação.

Na Tabela 11 encontram-se resumidos os resultados dos experimentos realizados nas condições otimizadas (°Brix = 10; pH = 4,5 e T = 30°C) para a biomassa (g/L), substrato (g/L) e exopolissacarídeo (g/L). Após 18 dias de processo, a bioconversão foi de 76,8%, em relação a concentração inicial do substrato em ART (g/L) para o produto, e de substrato em biomassa correspondeu a 2,4%.

Os valores experimentais para a biomassa (g/L) foram significativamente reduzidos após o décimo sexto dia de

experimentação, provavelmente em função da agregação do microorganismo ao exopolissacarídeo e da fase de morte celular.

O substrato residual, expresso em ART (g/L), apresentou valor correspondente a 16,53 (g/L) representando 23,17% em relação a concentração inicial.

Na Figura 6 estão plotados os dados experimentais para o substrato (g/L), exopolissacarídeo (g/L) e massa celular (g/L), cujos valores são médias de 3 réplicas.

Tabela 11. Resultados obtidos (g/L) a partir da condição otimizada (°Brix = 10; pH = 4,5 e T = 30°C) para massa celular, substrato e exopolissacarídeo produzido.

TEMPO (DIAS)	BIOMASSA (g/L)	SUBSTRATO ART (g/L)	EXOPOLISSACARÍDEO (g/L)
0	1,02	71,33	0
2	1,08	67,33	0
4	1,38	67,13	0
7	2,11	65,00	6,73
9	2,38	50,20	11,20
11	2,34	40,80	13,20
14	2,10	29,00	25,40
16	1,06	18,13	35,33
18	1,06	16,53	42,07

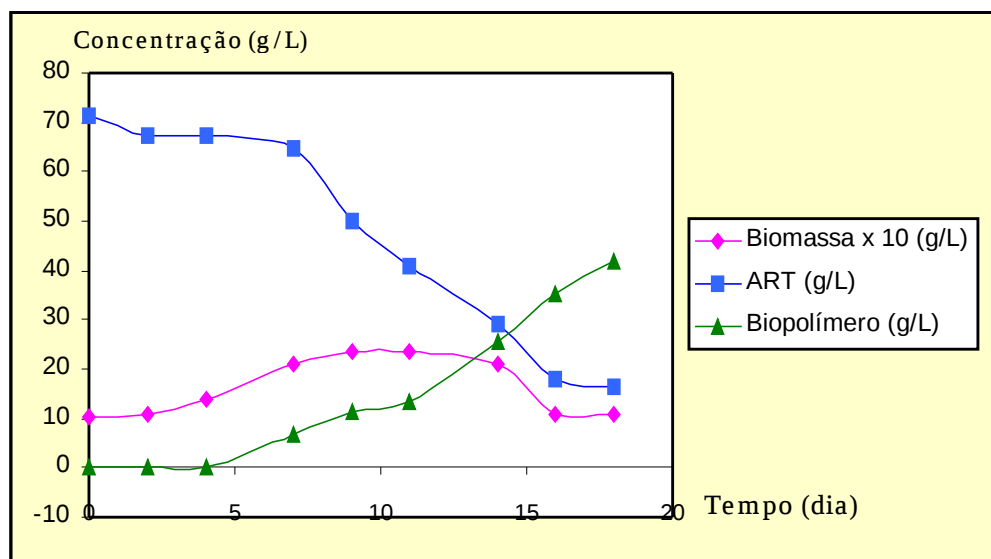


Figura 6. Substrato (ART g/L), exopolissacarídeos (g/L) e biomassa (g/L), na condição otimizada de máxima conversão ($^{\circ}\text{Brix} = 10$; $\text{pH} = 4,5$; $T = 30^{\circ}\text{C}$).

4.6. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO EXOPOLISSACARÍDEO

4.6.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E SOLUBILIDADE DO EXOPOLISSACARÍDEO

O material produzido pela propagação da bactéria *Zoogloea* sp. em melaço com 5,62% de umidade, apresentou os seguintes parâmetros de solubilidade (Tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros de solubilidade do exopolissacarídeo, utilizando a água e o ácido trifluoroacético.

SOLUBILIDADE	%
Solúvel H ₂ O	17,9
Solúvel TFA	72,2
Insolúvel	9,9

Os principais monossacarídeos na fração solúvel foram: glicose (87,6%); xilose (8,6%); manose (0,8%); ribose (1,7%); galactose (0,1%); arabinose (0,4%) e o ácido glucurônico (0,8%).

Com o objetivo de reduzir os açúcares solúveis, conferir maior resistência, preservarão as características físico-químicas dos períodos prolongados de estocagem, acondicionamento, esterilidade e agregar maior biocompatibilidade para aplicações nas áreas de medicina, sub-áreas de cirurgia clínica e experimental, foram introduzidos tratamentos no material original com água destilada, hipoclorito de sódio (5%), glutaraldeído (0,6%), álcool etílico (90%) e cloreto de sódio (0,9%).

4.6.2. ENSAIOS DE FUSÃO – DSC

Nos testes realizados de calorimetria diferencial exploratória – DSC, o exopolissacarídeo apresentou apenas uma temperatura de fusão

cristalina bem definida T_{ms} de 118°C (ARGÔLO, 2002), conforme a Figura 7, a seguir.

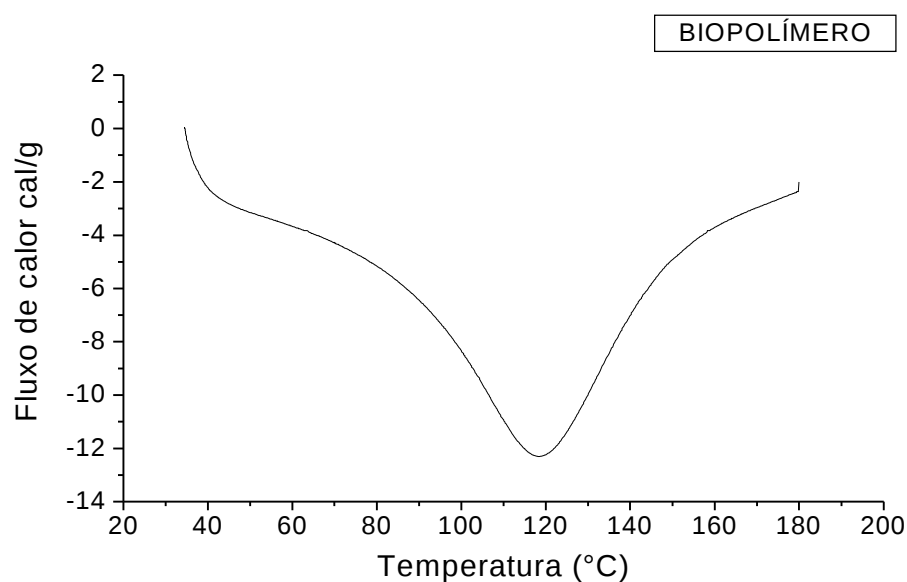


Figura 7. Termograma do exopolissacarídeo.

4.6.3. TESTES PRELIMINARES DE TRAÇÃO MECÂNICA

Na Tabela 13 estão especificados os resultados médios obtidos para o exopolissacarídeo nos itens técnicos relacionados à espessura, carga, tensão e alongamento de ruptura.

Tabela 13. Teste de tração mecânica realizado no exopolissacarídeo.

TESTE	RESULTADOS
Espessura	0,08 (mm)
Carga na ruptura	0,01 (kN)
Tensão de ruptura	30,9 (MPa)
Alongamento na ruptura	236 (%)

4.6.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO EXOPOLISSACARÍDEO

Observa-se nas Figuras 8 e 9 de maior ampliação que o aumento no microscópio eletrônico de varredura provocou uma deformação e fragmentação do exopolissacarídeo, não sendo possível obter as informações sobre os poros. Entretanto, utilizando-se o programa Paint Shop Pro e a maior ampliação 10.000X verificou-se que os mesmos possuem diâmetros inferiores a 1 μm , tendo aproximadamente 0,07 μm .

Desta forma, o método mostrou-se incapaz de determinar com exatidão o tamanho dos poros, sendo indicada a técnica da porozimetria.

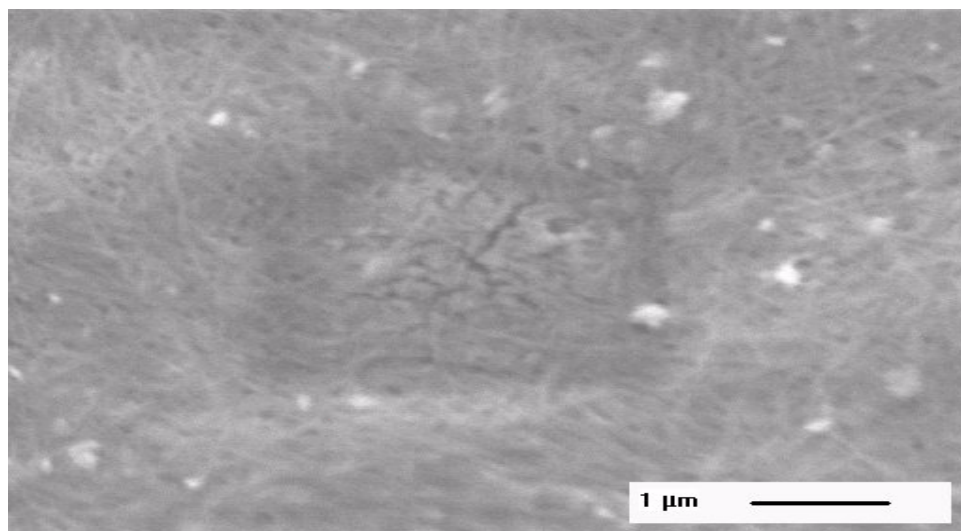


Figura 8. Imagens do exopolissacarídeo por técnica de microscopia eletrônica de varredura.

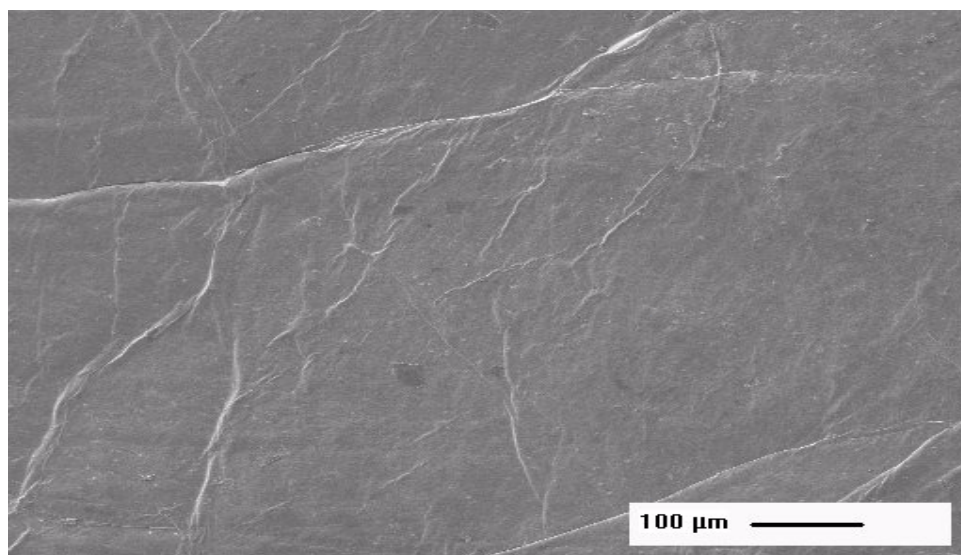


Figura 9. Análise morfológica do exopolissacarídeo realizada em microscopia eletrônica de varredura.

5. MODELAGEM CINÉTICA

5. MODELAGEM CINÉTICA

5.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO REACIONAL DE PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO

Os parâmetros cinéticos foram determinados aplicando-se técnicas de otimização, com o objetivo de reduzir o desvio entre as curvas obtidas pelos experimentos em batelada e as curvas teóricas baseadas nos modelos de Monod e Tessier, para representar a cinética de crescimento dos microorganismos.

O método de otimização adotado foi o “S.Q.P.” – Programação Quadrática Seqüencial, operacionalizado pelo programa não linear do Matlab 6.5, visando, a partir de uma estimativa inicial, direcionar as variáveis para o nível ótimo. Neste caso, a função objetivo relaciona os dados experimentais com os dados de simulação da biomassa, de substrato e produto.

Para a avaliação dos parâmetros do processo reacional de produção de exopolissacarídeos foram consideradas as seguintes hipóteses:

- § volume de controle estabelecido para a fase líquida;
- § volume constante, uniforme e homogêneo;

- § formação de exopolissacarídeos na fase líquida, por saturação e flotação do produto por densidade;
- § sistema isotérmico ($T = 30^{\circ} \text{C}$);
- § cinética de crescimento de microorganismo linear em relação à concentração mássica da biomassa;
- § cinética de morte celular linear em relação à concentração da biomassa;
- § cinética de consumo de substrato linear em relação à concentração mássica de biomassa;
- § cinética de manutenção dos microorganismos linear em relação à concentração da biomassa;
- § cinética de produção de exopolissacarídeos linear em relação à concentração da biomassa.

O balanço de massa sobre a biomassa, substrato e produto formado é expresso pelas três equações abaixo:

Balanço de massa sobre a biomassa:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X \quad (2)$$

Balanço de massa sobre o substrato:

$$\frac{dS}{dt} = -K_1\mu X - K_2X - K_3X \quad (3)$$

Balanço de massa sobre o produto:

$$\frac{dP}{dt} = K_3X \quad (4)$$

sendo:

X = concentração de biomassa (g/L)

S = concentração de substrato consumido (g/L)

P = concentração de produto formado (g/L)

μ = taxa de crescimento específico (dia⁻¹)

K_d = coeficiente de morte celular (dia⁻¹)

K_1 = coeficiente de consumo de substrato pela biomassa

K_2 = coeficiente de manutenção de biomassa (dia⁻¹)

K_3 = coeficiente de produção de exopolissacarídeo

t = tempo de experimentação (dia)

Foram testados dois modelos de crescimento celular para os dados experimentais obtidos em condições otimizadas (Tabela 13), quais sejam:

Modelo de Monod

$$\mu(S) = \frac{\mu_0 S}{K_m + S} \quad (5)$$

Modelo de Tessier

$$\mu(S) = \mu_0 \left[1 - \exp \left(- \frac{S}{K_m} \right) \right] \quad (6)$$

sendo:

μ_0 = taxa de crescimento específica máximo (dia⁻¹)

k_m = constante de Monod (g/L)

5.2. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS

O ajuste de parâmetros do modelo teórico consistiu em minimizar uma função quadrática que relacione pontos teóricos e experimentais, expressa pela função objetivo quadrática da forma.

$$Fo_{p1,p2,p3,\dots,pm} = \sum_i x_i \left(\Theta^{-1} \right)_i x_i^T \quad i = 1, N \quad (7)$$

sendo:

$p_1, p_2, p_3, \dots, p_m$ = variáveis de otimização (parâmetros da equação de balanço de massa);

ξ_i = vetor erro para o componente i, dado por Concentração teórica – Concentração experimental;

Θ_i = matriz de ponderação dos erros (matriz de covariância dos dados experimentais) para o componente i.

Temos, portanto, 3 componentes, $N = 3$ (biomassa, substrato e biopolímero) e 9 pontos experimentais para cada componente. O inverso da matriz de covariância serve como ponderação para que os erros experimentais na função objetivo tenham a mesma ordem de grandeza.

Seja o modelo matemático do processo (biomassa, substrato e produto), expresso pela equação:

$$\frac{dC}{dt} = f(C, p) \quad \therefore \quad \frac{dC}{dt} = \begin{pmatrix} \frac{db}{dt} \\ \frac{dS}{dt} \\ \frac{dP}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} P_1 \\ P_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ P_m \end{pmatrix} \quad (8)$$

sendo:

C = vetor de concentrações (C_1, C_2, C_3)

p = vetor de parâmetros do modelo ($P_1, P_2, \dots P_m$)

A função objetiva quadrática F_o dada por:

$$F_o = \sum_{i=1,3} (C_{teorico} - C_{experimental})_i (\Theta^{-1})_i (C_{teorico} - C_{experimental})_i^T \quad (9)$$

As matrizes Θ_1, Θ_2 e Θ_3 são diagonais de ordem 9×9 da forma ($K = 1, 2$ e 3):

$$\Theta_k = \begin{bmatrix} \Theta_{1,1} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \Theta_{2,2} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \Theta_{3,3} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \Theta_{4,4} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \Theta_{5,5} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \Theta_{6,6} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \Theta_{7,7} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \Theta_{8,8} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \Theta_{9,9} \end{bmatrix}$$

O algoritmo de otimização consistiu das seguintes etapas:

- 1) estabelecer os valores iniciais para os parâmetros da equação 9;
- 2) calcular os valores de C_i nos tempos referenciados na tabela;
- 3) calcular o vetor $erro_i = (C_{teorico} - C_{experimental})_i$, para cada componente;
- 4) construir a função objetivo quadrática F_o ;

- 5) entrar no procedimento de iteração da otimização (método de otimização);
- 6) obter os novos valores dos parâmetros;
- 7) efetuar um critério de parada;
- 8) para continuar, se necessário for, com a otimização, retornar para o item 2.

Observa-se na Tabela 14 os pesos da ponderação da função objetivo F_0 , considerando as condições experimentais otimizadas ($^{\circ}\text{Brix} = 10$; $\text{pH} = 4,5$; $T = 30^{\circ}\text{C}$) para a biomassa, substrato e produto.

Tabela 14. Pesos de ponderação da função objetivo F_0 , levando em consideração os dados experimentais (Tabela 11).

Pontos experimentais	Biomassa (g/L)	$(\Theta_{ii})_1$	Substrato (g/L)	$(\Theta_{ii})_2$	Exopolissacarídeo (g/L)	$(\Theta_{ii})_3$
1	1,02	0,0001	71,33	0,1	0	0,1
2	1,08	0,0001	67,33	0,1	0	0,1
3	1,38	0,0001	67,13	0,1	0	0,1
4	2,11	0,0001	65,00	0,1	6,73	0,1
5	2,38	0,0001	50,20	0,1	11,20	0,1
6	2,34	0,0001	40,80	0,1	13,20	0,1
7	2,10	0,0001	29,00	0,1	25,40	0,1
8	1,06	0,0001	18,13	0,1	35,33	0,1
9	1,06	0,0001	16,53	0,1	42,07	0,1

A partir de estimativas iniciais realizadas pelas equações de Monod e Tessier, levando em consideração os limites inferiores e superiores estabelecidos (ATKINSON & MAVITUNA, 1985) foram calculados os parâmetros cinéticos expressos na Tabela 15.

Em face da agregação de células ao exopolissacarídeo atribui-se um parâmetro de desaparecimento celular – K_{de} e uma nova expressão para o balanço de massa sobre a biomassa, expressa pela equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X - K_a X \quad (10)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - (K_d - K_a) X$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_{de} X$$

Sendo:

μ = taxa de crescimento específico (dia^{-1})

K_a = coeficiente de agregação celular ao exopolissacarídeo (dia^{-1})

K_d = coeficiente de morte celular (dia^{-1})

$K_{de} = K_d + K_a$ = coeficiente de desaparecimento celular (dia^{-1})

Tabela 15. Limites inferiores e superiores, valores ótimos para os parâmetros cinéticos de μ_0 (dia⁻¹), K_m (g/L), K_d (dia⁻¹), K_1 , K_2 (dia⁻¹), K_3 , obtidos para os modelos de Monod e Tessier.

Parâmetro (unidade)	Limite Inferior	Limite Superior	Modelo de Monod	Modelo de Tessier
μ_0 (dia ⁻¹)	0,001	10	4,249	4,187
K_m (g/L)	0,050	10	2,947	10,000
K_{de} (dia ⁻¹)	0,001	10	3,961	4,089
K_1	0,001	5	0,001	0,395
K_2 (dia ⁻¹)	0,001	10	1,630	0,001
K_3	0,001	2	0,264	0,263

Observa-se na Tabela 15 para os parâmetros cinéticos da taxa de crescimento máximo - μ_0 (dia⁻¹) e do coeficiente de desaparecimento total de células - K_{de} (dia⁻¹), em ambos os modelos estudados, Monod e Tessier, grandezas de mesma ordem.

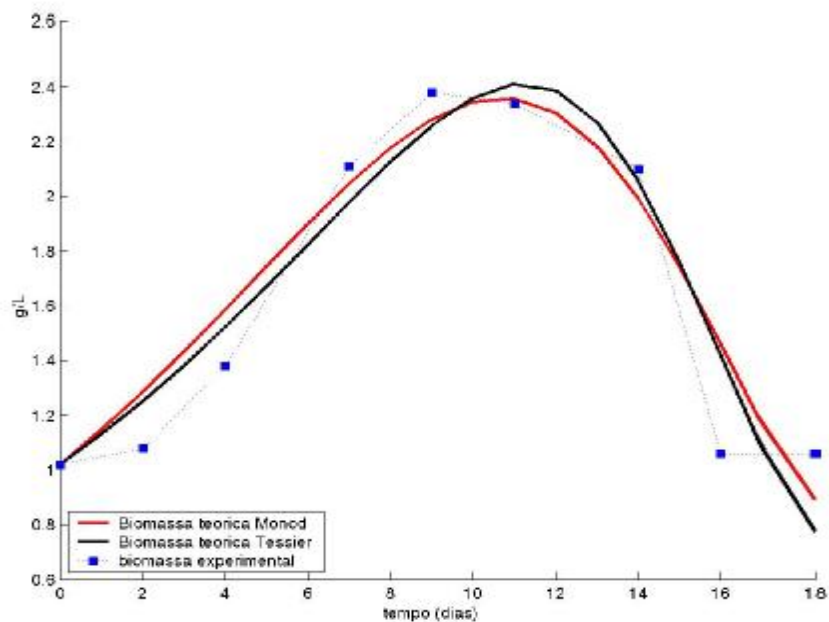
Este fato está provavelmente relacionado à agregação das bactérias ao exopolissacarídeo formado, potencializando o valor do coeficiente de morte celular - K_d (dia⁻¹).

Verifica-se para os parâmetros cinéticos de μ_0 , K_{de} e K_3 grandezas idênticas quando comparados aos modelos de Monod e Tessier. Para os valores de K_m , nos métodos acima citados, observam-se variações significativas. Para os parâmetros de K_1 e K_2 os valores obtidos apresentaram grandezas diferentes e opostas.

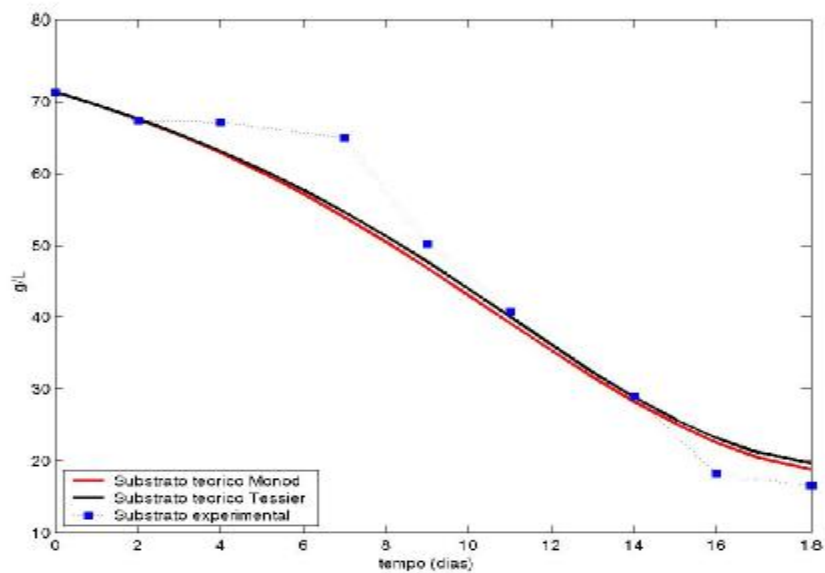
Os parâmetros cinéticos calculados para o modelo de Tessier coincidiram com os limites superior e inferior do K_m e K_2 . Este comportamento também foi observado, para o modelo de Monod, no limite inferior para o coeficiente de consumo do substrato pela biomassa K_1 .

A Figura 10 (a, b e c) apresenta as comparações entre os resultados experimentais e as simulações realizadas utilizando-se os modelos de Monod e Tessier para a biomassa, substrato e produto.

a)



b)



c)

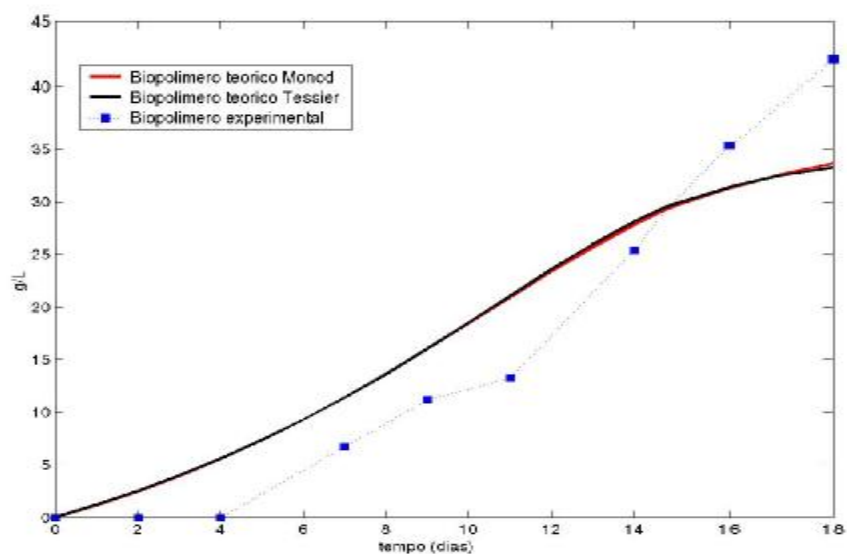


Figura 10. Comparação entre os resultados experimentais nas condições otimizadas e as simulações utilizando-se os modelos de Monod e Tessier.

a) Concentração de biomassa; b) Concentração de substrato; c) Concentração de produto.

Observa-se na Figura 10 que nenhum dos modelos estudados (Monod e Tessier) apresentou uma boa aproximação dos resultados experimentais otimizados.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram aplicadas, primeiramente etapa I, técnicas de planejamento fatorial, na investigação da influência de três variáveis: o °Brix, o pH e a temperatura, na produção de exopolissacarídeo via propagação celular da bactéria *Zoogloea* sp. em melaço de cana-de-açúcar. Os resultados experimentais obtidos apresentaram, para as condições de °Brix = 10, pH = 4,5 e T = 30°C, a maior conversão de substato em exopolissacarídeo.

Os dados experimentais desta etapa permitem definir o modelo estatístico experimental com 94,09% de variância expresso pela equação: $Y = 3,956 - 0,611.pH - 1,156.T + 0,341.°Brix.pH$.

A partir desta conclusão foram realizados os ensaios experimentais para a etapa II nas condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer, sem agitação, e os dados experimentais modelados segundo as Leis de Monod e Tessier. Os valores ótimos encontrados para os parâmetros cinéticos foram os seguintes:

Parâmetro	Modelo de Monod	Modelo de Tessier
μ_0 (dia ⁻¹)	4,2496	4,1873
K_m (g/L)	2,9476	10,0000
K_{de} (dia ⁻¹)	3,9610	4,0896
K_1	0,0010	0,3951
K_2 (dia ⁻¹)	1,6305	0,0010
K_3	0,2648	0,2632

Os parâmetros cinéticos de μ_0 e K_{de} apresentam grandezas da mesma ordem, em função da agregação de células ao exopolissacarídeo potencializando, nas condições experimentais estabelecidas, o coeficiente de morte celular. Sugere-se a realização de estudos direcionados à cinética de agregação dos microorganismos.

Após 18 dias de experimentação verificou-se uma taxa de conversão de substrato ART em exopolissacarídeo de 76,8%, e de substrato em biomassa de 2,4%.

A solubilidade total do exopolissacarídeo em água (17,9%) e em ácido trifluoracético (72,2%) correspondeu a 90,1%, sendo constituída esta fração solúvel dos monossacarídeos: glicose (87,6%); xilose (8,6%); manose (0,8%); ribose (1,7%); galactose (0,1%); arabinose (0,4%) e o ácido glucurônico (0,8%).

O exopolissacarídeo apresentou temperatura de fusão cristalina bem definida de 118°C.

As especificações obtidas nos testes de tração mecânica foram as seguintes: espessura (0,08 mm), carga de ruptura (0,01 kN), tensão de ruptura (30,9 MPa), alongamento na ruptura (236%).

A análise morfológica do exopolissacarídeo por microscopia eletrônica de varredura revelou diâmetro de poros em torno de 0,07 μm .

Observa-se também que as curvas obtidas, segundo os modelos de Monod e Tessier, para os parâmetros de biomassa, substrato e produto, apresentaram comportamento semelhante, quando comparados os dois modelos.

Os modelos estudados de Monod e Tessier não apresentaram uma boa aproximação dos resultados experimentais. Sugere-se a realização de estudos direcionados que levem em consideração o padrão cinético de crescimento semi-associado.

Estudos experimentais estão sendo desenvolvidos com o exopolissacarídeo produzido pela síntese do melaço via propagação da bactéria *Zoogloea* sp. na medicina veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Hospital Veterinário, no tratamento de animais

portadores de perdas cutâneas e, recentemente, nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica – Núcleo de Cirurgia Experimental – Universidade Federal de Pernambuco. Os resultados revelam grande potencial do exopolissacarídeo para uso nas diversas sub-áreas da cirurgia, tais como: cirurgia cardiovascular, angiologia, oftalmologia, urologia, neurocirurgia, cirurgia geral, plásticas, otorrinolaringologia e odontologia, além do emprego como suporte para cultura de tecidos com vistas a transposição, como também para fixação de íons, prótons e enzimas nas áreas de química e bioquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, U.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnología industrial. Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard, São Paulo, S.P. BRASIL. V.3, p. 219-245, 2001.

ARAÚJO, J.A. Controle microbiológico na fabricação do álcool etílico. Carpina, IAA/PLANALSUCAR, 137p. 1985.

ARGÔLO, E.J. Avaliação da capacidade biodegradadora de fungos em filmes poliméricos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Engenharia Química, Recife, 79p. 2002.

ASHTAPURE, A. A. & SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. Applied and Environmental Microbiology. V.61, n.3, p.1159-1162, 1995.

ATKINSON, B. & MAVITUNA, F. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Macmillan Publishers, England, 1985.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals. 2. Ed. New York: McGraw – Hill Book Company, 1986.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S. e BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Editora da UNICAMP, 1995.

BOBBIO, F.O . & BOBBIO, P.A . Introdução à química de alimentos. São Paulo: Varela Ltda., Cap. 1, 2ª ed., p.223, 1989.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. e HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building, 1978.

BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. Biology of microorganisms. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall International Editions. 6ª ed., p.874, 1991.

BUTTERFIELD, C.T. Studies of sewage purification. II. A Zoogloea-Forming bacterium isolated from activated sludge. U.S. Pub. Health Rep. 50, 671-684, 1935.

CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R.M.O.C.; FRANÇA, F.P. Antitumour activities of levans produce by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnology Letters. V.19, nº 1, p.19-21, 1997.

CHARRACKLIS, W.G. & MARSHALL, K.C. Biofilms. New York, chichester: A Willey Interscience, 796p. 1990.

COELHO, M.C.O.C.; CARRAZONI, P.G.; MONTEIRO, V.L.C.; MELO, F.A.D.; MOTA, R.A.; TENÓRIO FILHO, F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirúrgica Brasileira*. São Paulo, S.P. BRASIL. V.17, p.11-13, setembro, 2001.

CRABTREE, K.; McCOY E.; BOYLE W.C.; ROHLICH, G.A. Isolation, identification, and metabolic role of the sudanophilic granules of *Zoogloea ramígera*. *Appl. Microbiol.* V. 13, p.218-226, 1965.

DEMING, S.N. & MORGAN, S.L. Experimental design: a chemometric approach. 1987.

FENTANES, E.G. Polissacarídeos microbianos. In: RAMÍREZ, R.Q.; (Ed.), *Prospectiva de la biotecnología en México*. México: Fundación Javier Barros Sierra. P.73-92, 1985.

FRIEDMAN, B.A.; DUGAN P.R.; PFISTER R.M.; REMSEN C.C. Fine structure and composition of the zoogloeal matrix surrounding *Zoogloea amigera*. *J. Bacteriol.* V. 96. p. 2144-2153, 1968.

GALINDO, E.F. Polissacarídeos microbianos. In: Ramirez, R.Q. (ed.), *Prospectiva de la biotecnologia en México*, Fundación Javie Barros Siena, México, 1995.

GARRET, R.H. & GRISHAM, C.M. Biochemistry. Sanders college Publishing. Carbohydrates and cell surfaces. Cap. 10, 1995.

GEDDIE, J.L.; SUTHERLAND, I.W. Uptake of metal by bacterial polysaccharides. Journal of Applied Bacteriology, v.74, p.467-472, 1993.

GLAZER, N. & NIKAIDO, H. Microbial biotechnology fundamentals of applied microbiology. New York. H. Freeman and Company, 2^a ed., p.642, 1995.

GOUVEIA, E.R. Investigação sobre o crescimento de um *Bacillus alcalophilus* produtor de protease. 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Escola de Engenharia UFPE), 1997.

HAN, Y.D. Microbial levan. Adv. Appl. Microbiol. 35, p.171-94, 1990.

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J.D.; WISE, D.L.; TRANTOLO, D.J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. Journal of Biotechnology, V. 86, p. 135-150, 2001.

ICUMSA, Methods book. Colney, International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, 225p. 1994.

IKEDA, F.; SHUTO, H.; SAITO, T.; FUKUI, T.; TOMITA, K. Na extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea ramigera*. V.115, European Journal of Biochemistry. V.123, p.437-445, 1982.

IMRE, F.K.E. & TILBURY, R.H. Polysaccharides in sugar cane and its products. Powder Technology. V.1, p.291-361, 1972.

ITZIGSOHN H. Entwicklungsvorgänge von *Zoogloea*, *Ocelloria*, *Synedra*, *Syaurastrum*, *Spirotaenia* und *Chroolepus*. Sitzungs-Berichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. p. 30-31, 1868.

KAY, A.; ISHINO, T.; ARASHIDA, T. et al. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ^{13}C -labeled glucose as carbon source. Carbohydrate Research. V. 240, p.153-159, 1993.

KHACHATOORIAN, R.; PETRISOR, I.G.; KWAN, C.; YEN, T.F. Biopolymer plugging effect: laboratory-pressurized pumping flow studies. Journal of Petroleum Science and Engineering. V. 38, p.13-21, 2003.

KENNEDY, J.F. & WHITE, C.A. Bioactive carbohydrates: In Chemistry, Biochemistry and Biology. England: Ellis Horwood Limited. 319p. 1993.

LAMBLIN, G.; LHERMITTE, M.; DEGAND, P.; ROUSSEL, P.; SLAYLER, H. Biochimie, 61, 23, 1979.

LEE, H.K.; CHUN, J.; MOON, E.Y.; KO, S.; LEE, D.; LEE, H.S.; BAE, K.S. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51, 661-666, 2001.

LEE, J.W.; YEOMANS, W.G.; ALLEN, A.L.; GROSS, R.A.; KAPLAN, D.L. Production of *Zoogloea ramigera* with glucose analogs. Biotechnology Letters. V.19(8), p.799-802, 1997.

LEIBOVICI, J.; SUSSKIND-BRUDNER, G.; WOLMAN, M. Direct antitumour effect of hig-molecular weight levan on lewis lung carcinoma cells in mice. J. Natt. Cancer Inst. V.65, n.2, p.391-395, 1980.

LOPES, L. & ANDRADE, C.T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. Revista de Química Industrial, nº 703, p.19-23, 1995.

LOPES, L.M.A. Influência da presença de agregados sobre propriedades em solução da goma welana. 172p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro – IMA, Rio de Janeiro. 1996.

LU, F.; LUKASIK, J.; FARRAH, S.R. Immunological methods for the study of *Zoogloea* strains in natural environments. Wat. Res. V. 35, n. 17, p.4011-4018, 2001.

MANO, E.B. Introdução a polímeros. Edgard Blucher. São Paulo, 3ª ed., p.111, 1985.

MAPA Secretaria de Produção e Comercialização. Acompanhamento da produção sucroalcooleira; safra 2001/2002. Brasília, DF. MAPA, 2002.

MARGARITIS, A. & PACE, G.W. Microbial polysaccharides. In: Comprehensive Biotechnology. V.49, n. 3, p.1005-1044, 1985.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 75(1), 18-22, 1993.

MELO, F.A.D.; COELHO, M.C.O.C.; FERREIRA, V.M.; MONTEIRO, V.L.; CARRAZONE, P.G. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. Anais 7º Congresso STAB, 25 a 28 de outubro. Londrina, Paraná, Brasil. p.251-255, 1999.

MIKKELSEN, A.; STOKKE, B.T.; CHRISTENSEN, B.E.; ELGSAETER, A. Biopolymers. 24, 1683, 1985.

MOTTA SOBRINHO, M.A. Relatório de missão em visita ao Laboratório des Sciences de Génie Chimique (UP 6811), Nancy, France. Recife, UFPE. Departamento de Engenharia Química, 2002.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J.H.T.; LEDUY, A. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. Biotechnology and Bioengineering. V.32, p.639-646, 1988.

MURPHY, N.F. et al. Composition of Puerto Rican molasses during three consecutive harvest seasons and its behavior in fermentation, Bulletin 261, September, 1979.

ODIAN, G. Polyethylene. Principles of polymerization. John Wiley & Sons Co., Inc. New York. N.Y., USA, 3^a ed., p.305-656, 1991.

OKIYAMA. A.; MOTOKI, M.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. Food Hydrocolloids, 6(15), 479-487. 1992.

OLBRICH, H. O melaço, sua importância e emprego, com especial referência à fermentação e à fabricação de levedura. 3^a edição, Rio de Janeiro, 1960.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações. Makron Books. São Paulo, S.P., BRASIL. V.II. ed. 2^a. p.359-363, 1996.

PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell, New York, 1975.

ROLLER, S. & DEA, I.C.M. Biotechnology in production and modification of biopolymers for foods. Critical Reviews in Biotechnology. V.12, p.261-175, 1992.

ROSEIRO, J.C.; ESGALHADO, M.E.; COLLAÇO, M.T.A. et al. Medium development for xanthan production. Process Biochemistry. V.27, p.167-175, 1992.

SANDFORD, P.A. & BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.). The polysaccharides, vol. 2, Academic Press, New York, p.411. 1983.

SINCLAIR, C.G. & CANTERO, D. Fermentation modeling. In: Fermentation: A practical approach. Editado por B. MacNeil & L.M. Harvey, Oxford University Press, cap. 4. 1990.

STEINBÜCHEL, A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. Current Opinion in Microbiology. V. 6, p.261-270, 2003.

SUTHERLAND, I.W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge: Cambridge University Press, p.163, 1990.

SUTHERLAND, I.W. Industrially useful microbial polysaccharides. Microbiological Sciences. V.3, n. 1, p.5-9, 1996.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends in Biotechnology. V.16, n.1, p.41-46, 1998.

TAGER, A. Physical Chemistry of Polymers, Moscow: Mir Publishers, 2^a ed., p.652, 1978.

TAKAI, M. Bacterial Cellulose. In: R.D. Gilbert (ed.), Cellulosic Polymers, Blends and Composites (pp. 233-240), Munich, Hanser Publishers, 1994.

TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic considerations on polysaccharide functions. Polysaccharides came first. Carbohydrate Polymers, V. 54, p.371-380, 2003.

UHLINGER, D.J. & WHITE, D.C. Applied and Environmental Microbiology, 45, 64, 1983.

UNZ, J.F. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. London: Williams & Wilkins, V.1, p.199-210. 1984.

UNZ, R.F. Neotype strain of *Zoogloea ramigera* Itzigsohn. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 21, p.91-99, 1971.

UNZ, R.F. & DONDERO, N.C. The predominant bacterial in natural zoogloeal colonies I isolation and identification. *Canadian J. Microbiol.* V. 13, p.1671-1682, 1967.

VASCONCELOS, J.N. Operação e simulação do processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada com vazão variável de alimentação. Rio de Janeiro, 229p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Bioquímicos – Escola de Química da UFRJ). 1987.

VELDE, K.V. & KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, V. 21, p.433-442, 2002.

WALTON, A.G. & BLACKWHEEL, J. Biopolymers. New York. Academic Press, p.465-511, 1973.

YALPANI, M. & SANDFORD, P. Commercial polysaccharides: recent trends and developments. In: Industrial polysaccharides – Progress in Biotechnology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. V.3, p.311-336, 1987.

APÊNDICE 1

DEPÓSITO DE PEDIDO DA PATENTE INPI

INPI/PE

11 JUL 16 04 001254

PROTOCOLO GERAL

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	(uso exclusivo do INPI)	depósito / /
	 PI0206132-5 Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):		
1.1	Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	
1.2	Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO	1.3 CGC/CPF: 24134488000108
1.4	Endereço completo: AV. PROF. MORAES REGO, 1235 CEP 50670-901, CIDADE UNIVERSITÁRIA - RECIFE -PE	
1.5	Telefone: (81)3271-8601	☐ continua em folha anexa
	FAX: (81)3271-8601	
2. Natureza:		
☒ 2.1	Invenção	☐ 2.1.1. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3.	Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54): "Biomenbranas produzidas a partir do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microorganismo Zooglea sp., para fins de aplicação nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica."
	☐ continua em folha anexa

4.	Pedido de Divisão do pedido nº. , de
5.	Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade: Nº de depósito Data de Depósito (66)
6.	Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
	88	



☐ continua em folha anexa

7. Inventor (72):
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: **Francisco de Assis Dutra Melo**

7.2 Qualificação: **Engenheiro Químico**

7.3 Endereço: **Rua Marly Figueiredo, 697 – Aptº 301, Casa Caiada – Olinda – PE**

7.4 CEP: **53130-310**

7.5 Telefone **81) 3432-1074**
☒ continua em folha anexa

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:
☐ em anexo

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

☐ em anexo

10. Procurador (74):

10.1 Nome

CPF/CGC:

10.2 Endereço:

10.3 CEP: 10.4 Telefone

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒ 11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	02 fls.
☐ 11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	03 fls.
☐ 11.3 Documentos de prioridade	fls.	☐	11.7 Desenhos	fls.
☐ 11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	02 fls.
☒ 11.9 Outros (especificar): anexo inventores				02 fls.
☐ 11.10 Total de folhas anexadas:				10 fls.

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Local e Data: Recife, 07/set/2002

Local e Data:

AUTENTICAÇÃO

Assinatura e Carimbo

CERTIFICO QUE A PRESENTAÇÃO DO REPRODUTO DO ORIGINAL ME FOU APRESENTADO DOUFE

Valido somente com selo da autoridade e fiscaliz

Mozart Neves Ramos

TRIBUNAL DE JUSTIÇA DE Pernambuco

REITOR/UFPE

Selo de Autenticidade

07 JUL 2003

AUTENTICAÇÃO

EM TESTE DA VERDADE

AKE 83800

RECEBIMOS

22/08/03

RECEBIMOS

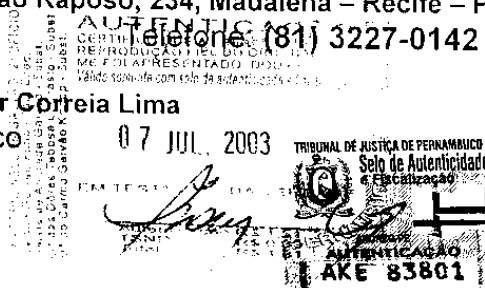
43133

RECEBIMOS

ANEXO 1

INVENTORES:

1. Nome: **Virgínia Medeiros Ferreira de Amorim**
Qualificação: Técnica de laboratório
Endereço: **Av. Juscelino Kubstchek de Oliveira – Vila da UFRPE,
Casa 03, Bairro Novo – Carpina – PE**
CEP: 55.810-000 Telefone: (81) 3621-6745
2. Nome: **Josias Rufino dos Santos**
Qualificação: Auxiliar de laboratório
Endereço: **Av. Dantas Barreto, 78, São Sebastião – Carpina – PE**
CEP: 55.810-000 Telefone: (81) 3621-5143
3. Nome: **Antonio Gonçalves Ramos**
Qualificação: Técnico de laboratório
Endereço: **Rua Antonio Cavalcante de Albuquerque, 29, São
Sebastião – Carpina – PE**
CEP: 55.819-908 Telefone: (81) 3621-4552
4. Nome: **José Lamartine de Andrade Aguiar**
Qualificação: Médico
Endereço: **Av. Beira Mar, 4220 – Aptº 1201, Piedade – Jaboatão dos
Guararapes – PE**
CEP: 54.420-000 Telefone: (81) 3468-3367
5. Nome: **Renato Dornelas Câmara Neto**
Qualificação: Médico
Endereço: **Rua Dom João de Souza, 122 – Aptº 201, Madalena –
Recife – PE**
CEP: 50.610-070 Telefone: (81) 9975-5544
6. Nome: **Antonio Roberto de Barros Coelho**
Qualificação: Médico
Endereço: **Rua Galvão Raposo, 234, Madalena – Recife – PE**
CEP: 50.610-330 Telefone: (81) 3227-0142
7. Nome: **Salvador Vilar Correia Lima**
Qualificação: Médico



Endereço: Av. Flor de Santana, 224 – Aptº 301, Parnamirim – Recife – PE

CEP: 52060-290

Telefone: (81) 3268-3313

8. Nome: José Falcão Correa Lima Filho

Qualificação: Médico

Endereço: Av. Boa Viagem, 5072 – Aptº 301, Boa Viagem – Recife – PE

CEP: 51.030-000

Telefone: (81) 3341-7698

9. Nome: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Qualificação: Médica

Endereço: Rua Salgueiro Branco, 30, Jardim Atlântico – Olinda – PE

CEP: 53060-290

Telefone: (81) 3432-1324

10. Nome: Norma Thomé Jucá

Qualificação: Médica

Endereço: Rua Rosângela Wanderley, 61/401, Piedade – Jaboatão dos Guararapes – PE

CEP: 54420-180

Telefone: (81) 3361-4215

11. Nome: Mohand Benachour

Qualificação: Engenheiro Químico

Endereço: Rua dos Navegantes, 2886/204, Boa Viagem – Recife – PE

CEP: 51111-080

Telefone: (81) 3466-2471

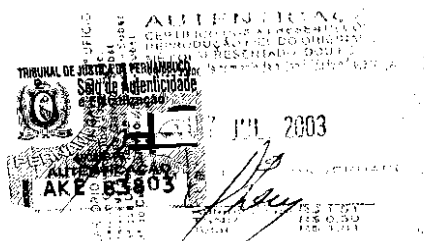
12. Nome: Sérgio Lucena

Qualificação: Engenheiro Químico

Endereço: Rua Conde de Irajá, 937 – Aptº 02, Torre – Recife – PE

CEP: 50.710-310

Telefone: (81) 3445-1484



"Biomembranas produzidas a partir da síntese do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microorganismo *Zooglea* sp., para fins de aplicação nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica."

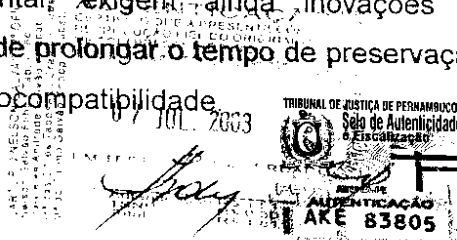
5 A presente invenção refere-se a estruturas laminares com espessuras variáveis, membrana constituída de um biopolímero, produzida pela bactéria *Zooglea* sp., a partir do melaço da cana-de-açúcar e outros açúcares.

Os setores de saúde nas áreas de medicina, sub-áreas de
10 cirurgia clínica e experimental, são demandantes de materiais de origem sintética e biológica para utilização em enxertos e próteses. Esses materiais podem ser aplicados nas diversas sub-áreas da cirurgia, tais como: cirurgia cardiovascular, angiologia, oftalmologia, urologia, neurocirurgia, cirurgia geral, plástica, otorrinolaringologia e
15 odontologia, além do emprego como suporte para cultura de tecidos com vistas a transposição, como também para fixação de íons, prótons e enzimas nas áreas de química e bioquímica.

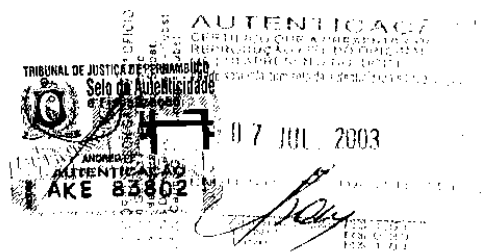
Várias patentes já foram depositadas, relativas às estruturas sintéticas e biológicas como pericárdio, dura-máter e vasos
20 sanguíneos preservados.

As patentes referentes aos materiais sintéticos correspondem a produtos de alta tecnologia de produção, o que onera significativamente o produto final, além de exigir tecnologia específica para cada fim ou aplicação.

25 Os produtos de origem biológica, já amplamente utilizados na prática clínica e experimental, exigem ainda inovações no tratamento, com a finalidade de prolongar o tempo de preservação, agregar maior resistência e biocompatibilidade.



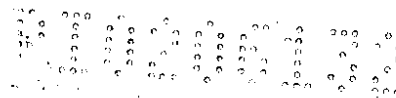
O produto descrito neste documento tem origem e características biológicas, como: estrutura química, elasticidade, resistência e durabilidade que permitem a realização de remendos de veias e artérias, átrio cardíaco e pericárdio em cirurgia cardiovascular, drenagem de glaucoma e reparos de estruturas oculares em oftalmologia; próteses, reparos e técnicas de expansão, em urologia; remendos e plásticas de estruturas cérebro-raquianas, como dura-máter, em neurocirurgia; reparos e fixação do trato digestivo, em cirurgia gastrointestinal; reforço de estruturas e falhas de paredes orgânicas, como no tratamento das hérnias, em cirurgia geral; confecção de próteses ligamentares, em traumatologia; cirurgia corretiva de retrações gengivares, em odontologia; plástica de perfurações do tímpano, timpanoplastias em cirurgia otorrinolaringológica; próteses tubulares para implantes de segmentos orgânicos como colédoco e esôfago, em cirurgia gastroenterológica; e artéria e veia, em cirurgia vascular.



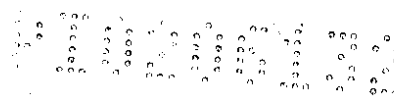


REIVINDICAÇÃO

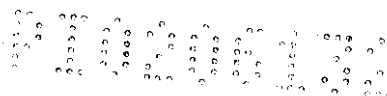
1. "Biomembranas produzidas a partir da síntese do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microorganismo *Zooglea* sp., para fins de aplicação nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica." Membrana de biopolímero produzida pelo microorganismo *Zooglea* sp., a partir de melaço de cana-de-açúcar, é constituída por açúcares 84%, água 5,6% e insolúveis 9,9%.
2. A membrana, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizada por estrutura de açúcar polimerizado com extensão e espessura variável, elasticidade e resistência definida.
3. As membranas de estrutura polimérica "in natura" com açúcares residuais do meio de cultura apresentam propriedades adequadas para utilização clínica e experimental.
4. As membranas caracterizadas na reivindicação 3 são desidratadas e no estado "in natura" são acondicionadas em embalagem hermética e esterilizadas em radiação gama.
5. As membranas, de acordo com as reivindicações 3 e 4, têm propriedades físico-químicas de inibição do crescimento bacteriano e são indicadas como curativos no tratamento de feridas infectadas.
6. As membranas descritas na reivindicação 1 são tratadas em água destilada para eliminar os açúcares residuais.
7. As membranas hidratadas no processo de redução de açúcares residuais, reivindicação 6, são desidratadas em álcool etílico em concentração crescente, com osmolaridade ajustada para 320 mOs com cloreto de sódio.



8. Após o tratamento descrito na reivindicação 6, as membranas hidratadas são tratadas em glutaraldeído a 0,6% para agregar maior resistência e estabilidade para utilizações clínicas específicas.
- 5 9. Após o processo descrito na reivindicação 8, as membranas são lavadas em água destilada para reduzir o excesso de glutaraldeído.
- 10 10. As membranas hidratadas após o tratamento dado na reivindicação 9 são desidratadas de acordo com a reivindicação 7.
- 15 11. As membranas desidratadas pelo processo descrito nas reivindicações 7 e 10 são acondicionadas em álcool isopropílico a 86% em envelopes herméticos em solução salina a 0,9% com a osmolaridade ajustada em 320 mOs com cloreto de sódio.
- 20 12. Para a utilização clínica ou experimental, as membranas acondicionadas de acordo com a reivindicação 11 são esterilizadas por meio de raios gama.
- 25 13. As membranas para as múltiplas aplicações na área de saúde, no âmbito clínico e experimental, podem ser moldadas primariamente no processo de produção, em formas e modelos para fins específicos.
14. Os modelos em forma plana podem ser aplicados "in natura", reivindicação 5 ou tratadas de acordo com a reivindicação 12 para a utilização em reforço de parede abdominal, correção cirúrgica de hérnias, contenção visceral nas deiscências e peritonite em cirurgia geral; remendos de lesões vasculares arteriais e venosas, átrio, ventrículo e válvulas cardíacas em cirurgia cardiovascular; remendos de



- 5 lesões do trato gastro intestinal, esôfago, estômago, intestino delgado e col retal em cirurgia gastroenterológica; reparos de lesões cutâneas em cirurgia de queimados e plástica; expansão de bexiga, plástica de ureter, plástica e correção de fibrose peniana, suspensão da junção uretro vesical na
- 10 incontinência urinária na cirurgia urológica; prótese dural em cirurgia neurológica; forro orbital e drenagem de glaucoma em cirurgia oftalmológica; correção de retração gengival em odontologia; preenchimento de falhas no celular subcutâneo em cirurgia plástica; plástica de lesões timpânicas, timpanoplastia em cirurgia otorrinolaringológica; plástica de ligamentos e tendões em cirurgia traumato-ortopédica.
- 15 15. Os modelos tubulares tratados de acordo com a reivindicação 12 têm aplicabilidade na reconstrução de estruturas orgânicas como esôfago e colédoco, em cirurgia gastroenterológica; reconstrução de segmentos de ureter e uretra em cirurgia urológica; prótese, vascular, arterial e venosa em cirurgia vascular.
- 20 16. As membranas planas tratadas na reivindicação 12 podem ser utilizadas para suporte de cultura de tecidos "in vitro" para transposição "in vivo" e fixação de moléculas, enzimas, íons e sais para utilização físico-química.



RESUMO

"Biomembranas produzidas a partir da síntese do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microorganismo *Zooglea* sp., para fins de aplicação nas áreas de medicina clínica e experimental e bioquímica." As membranas foram inicialmente lavadas em água, tratadas com hipoclorito de sódio a 5%, fixadas em glutaraldeído a 0,6% e desidratadas em álcool etílico a 90% e 100%. Para estocagem, as membranas são acondicionadas em álcool isopropílico a 86%, em envelopes de filme de polipropileno rotuladas e seladas em seladoras térmicas e expostas à irradiação gama para esterilização, preservando todas as características físico-químicas.

Os autores consideram o estudo da arte, biomembranas, BIOME, própria para aplicação nas seguintes áreas:

- Aplicação físico-química, como fixação de enzimas e partículas sólidas e iônicas;
- Fixação de células em meio de cultura, para transposição de tecidos;
- Confeção de lâminas e tubos para prótese, em cirurgia cardiológica e vascular;
- Em cirurgia urológica para correção e plástica de pênis, ureter e uretra, suspensão e expansão de bexiga. Em cirurgia gastroenterológica, expansão e proteção de bolsas, reparos de lesões esofágicas, gástricas, intestinais e das vias biliares. Em cirurgia oftalmológica, descompressão na drenagem de glaucoma e forro orbital. Na cirurgia plástica, como preenchimento de espaços e tratamento de queimados. Na odontologia, no tratamento das retrações gengivares. Na cirurgia otorrinolaringológica para a plástica de tímpano;

2 / 2



- Lâminas para correção de defeitos em estruturas orgânicas em cirurgia geral e torácica como correção e reforço nas cirurgias das hérnias;
- Tratamento de queimados e de feridas infectadas.